

Aus dem Med. Zentrum für Pathologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Moll
Abteilung für Neuropathologie
Leiter: Prof. Dr. H.-D. Mennel

**Molekulargenetische Charakterisierung
des Gens für den
Rezeptor des Epidermalen Wachstums-Faktors
an experimentell erzeugten Hirntumoren der Ratte**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der

PHILIPPS - UNIVERSITÄT
M A R B U R G

vorgelegt von

Christian Kühne
aus Münster/Westfalen

Marburg 1999

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 06.07.2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. J. Schlegel

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. K. Seifart

2. Korreferent Prof. Dr. W Schachenmayr

meinen Eltern
in tiefer Dankbarkeit

ABKÜRZUNGEN	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 EPIDEMIOLOGIE VON HIRNTUMOREN.....	9
1.2 THERAPIE VON HIRNTUMOREN: GESTERN, HEUTE, MORGEN.....	11
1.3 GRUNDZÜGE DER TUMORENTSTEHUNG.....	14
1.4 PROBLEMSTELLUNG.....	16
1.4.1 CHEMISCHE KARZINOGENESE.....	17
1.4.2 REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN UND SIGNALTRANSDUKTION.....	19
1.5 EGF UND EGF-REZEPTOR.....	28
1.5.1 EGF.....	28
1.5.2 EGFR.....	29
1.6 EGF-REZEPTOR-VARIANTE.....	30
1.7 ÜBEREXPRESSION IN HUMANEN GLIOMEN.....	33
1.8 PERSPEKTIVEN.....	36
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	38
3 MATERIAL UND METHODEN	39
3.1 VERBRAUCHSMATERIAL.....	39
3.1.1 CHEMIKALIEN.....	39
3.1.2 GERÄTE.....	39
3.1.3 PCR- PRIMER.....	39
3.1.4 ANTIKÖRPER.....	42
3.1.5 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	43
3.1.6 TUMORMATERIAL.....	44
3.1.6.1 Tumorgewebe.....	44
3.1.6.2 Transplantations-Tumorlinien.....	44
3.1.6.3 Zelllinien.....	46
3.2 METHODEN.....	48
3.2.1 DNA-ISOLIERUNG.....	48
3.2.2 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	48
3.2.2.1 Auswahl der Oligonucleotid-Primer.....	48
3.2.2.2 Transkriptionsstellen am EGF-Rezeptor-Gen.....	49
3.2.2.3 PCR-Reaktionsbedingungen.....	49
3.2.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	50
3.2.3.1 Herstellung der Paraffinschnitte.....	51
3.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	51
3.2.3.3 Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) Reaktion nach Sternberger (1970).....	51
3.2.4 RNA-ISOLIERUNG.....	53
3.2.4.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	53
3.2.5 GEL-ELEKTROPHORESE.....	54
3.2.5.1 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	54
3.2.5.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
4 ERGEBNISSE	55
4.1 DAS GEN FÜR DEN REZEPTOR DES EPIDERMALEN WACHSTUMSFAKTOR.....	55
4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION.....	59
4.2.1 EXPRESSION DER EGFR-MRNA.....	59
4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	61

4.3.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DES REZEPTOR-PROTEINS.....	61
5	DISKUSSION	62
5.1	ANFORDERUNGEN AN DAS MODELLSYSTEM.....	64
5.2	KRITISCHE BEWERTUNG DER EINGESETZTEN METHODEN.....	64
5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM EGF-REZEPTOR-GEN	66
5.3.1	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE IM EINZELNEN.....	68
5.5	BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE FÜR DAS VORLIEGENDE MODELLSYSTEM.....	75
5.5.1	WAS MÜSSEN MODELLSYSTEME LEISTEN?.....	75
5.5.2	WAS LEISTEN AKTUELLE MODELLSYSTEME?.....	76
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
7	LITERATURVERZEICHNIS	80
8	ANHANG.....	104
8.1	CURRICULUM VITAE	104
8.2	ERKLÄRUNG.....	106
8.3	AKADEMISCHE LEHRER	107
8.4	DANKSAGUNG.....	108

Abkürzungen

AA	Anaplastisches Astrozytom
ÄNH	Äthylnitrosoharstoff
CT	Computer-Tomo-graphie
CEF	Chicken Embryo Fibro-blasts
ECD	Extra Celluar Domain
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGF	Epidermal Growth Factor
ENU	Ethylnitrosourea
ERI	EGFR-Related Inhibitor
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAP	GTPase-Activating Protein
GBM	Glioblastoma multiforme
GD-AIF	Glioma Derived Angiogenesis Inhibitory Factor
GFR	Growth Factor Receptor

GMRP	Guanine Nucleotide Release Protein
HER	Human EGF Receptor
ICD	Intra Cellular Domain
IGFR	Insulin-like Factor Receptor
IR	Insulin Receptor
MAP	Mitogen Activate Protein
M-CSFR	Macrophage Colony stimulating Factor Receptor
MNH	Methylnitrosoharnstoff
MNU	Methylnitrosourea
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NRK	Normal Rat Kidney
PDGFR	Platted Derived Growth Factor Receptor
PNET	Primärer Neuro-Ektodermaler Tumor
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RFI	Rezidiv Freies Intervall

SPECT	Single Proton Emissions Computer Tomographie
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TGF	Transforming Growth Factor
TMD	Trans Membrane Domain
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie von Hirntumoren

Beschäftigt man sich mit der aktuellen Literatur zu dem Thema der primären Hirntumoren, so wird die jährliche Inzidenz an primären Hirntumoren – dazu zählen neben den eigentlichen Hirngeschwülsten ebenso die von den Hirnnerven und den Meningen ausgehenden Prozesse – in den Industrieländern mit durchschnittlich 10.2 Neuerkrankungen unter 100 000 Einwohnern (Steiner et al., 1998) - angegeben. An der Gesamtzahl aller an Krebs Verstorbenen beträgt der Anteil der primären Hirntumoren nicht mehr als 3-5% (Preston-Martin et al., 1993; Fine H A, 1994), trotzdem zählen Hirntumoren bei der jungen Bevölkerung zu den fünf häufigsten Krebslokalisationen bei der tumorverursachten Mortalität (Boing C C, 1993). Nach Schirmer (1994) sind etwa 3% aller Todesfälle bei Tumorerkrankungen durch intrakranielle Tumore bedingt. Bei Kindern sind sie sogar, nach den Leukosen, die zweit häufigste maligne Geschwulst (Staneczek, 1984) und für ca. 2% der Krebstode verantwortlich (Kayne und Laws, 1995). Suchenwirth (1982) berichtet über 339 Patienten mit Hirn-Tumoren über einen Zeitraum von 10 Jahren im eigenen Krankengut, entsprechend einem Anteil von 4.5% aller stationär Behandelten. Ausgehend von den aktuellen epidemiologischen Studien, ist bei den primären Hirntumoren in Deutschland mit jährlich bis zu 8000 Neuerkrankungen zu rechnen (Steiner et al., 1998). Für an hirneigenen Tumoren Erkrankte würde das eine abgeleitete Mortalitätsrate von bis zu 5200 Todesfälle pro Jahr bedeuten.

Bei bis zu 60% dieser Hirntumore handelt es sich um Gliome (Radhakrishnan et al., 1995), deren Inzidenz in Europa und Nordamerika mit 5.6 Neumanifestationen pro 100 000 Einwohner und Jahr angegeben wird und bevorzugt in den mittelalten Lebensjahren – mit Präferenz des männlichen Geschlechts – auftreten (s. Abb.1). Gliome weisen unterschiedliche Differenzierungsgrade auf, denen nach der WHO-Klassifikation verschiedene Malignitätsgrade (WHO-Grad I bis IV) zugeordnet werden (Kleihues et al., 1993b). Mit etwa einem Drittel der Neuerkrankungen ist der Anteil maligner Gliome, z.B. des Glioblastoma multiforme (GBM), relativ hoch.

Das GBM ist der häufigste gliale Tumortyp und gehört zu den bösartigsten Krebsgeschwülsten (Davis et al., 1999); es zeichnet sich durch einen äußerst ungünstigen klinischen Verlauf aus, dessen Diagnose aufgrund seines raschen und infiltrativen Wachstums meist innerhalb eines Jahres (Walker et al, 1980; Shapiro, 1986) ein qualvolles Leiden und Sterben bedeutet.

Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei unter 5% (Kallio et al.; 1991) (s. Tab. 1) und selbst multimodale Therapieverfahren, wie chirurgische Intervention und postoperative Radiatio, führen bei den weitaus meisten Fällen lediglich zu einem Überlebenszeit-Gewinn von einigen Monaten.

		2-Jahres- Überlebens- rate (%)		5-Jahres- Überlebens- rate (%)	
	Fallzahl	Beobachtet	Relativ	Beobachtet	Relativ
Glioblastom	7234	8.4	8.8	2.8	3.2

Tab. 1 Beobachtete und Relative 2- und 5-Jahres-Überlebensraten für maligne Hirntumoren: SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Data) 1979-1993 (Kallio et al.; 1991). (Ausschnitt).

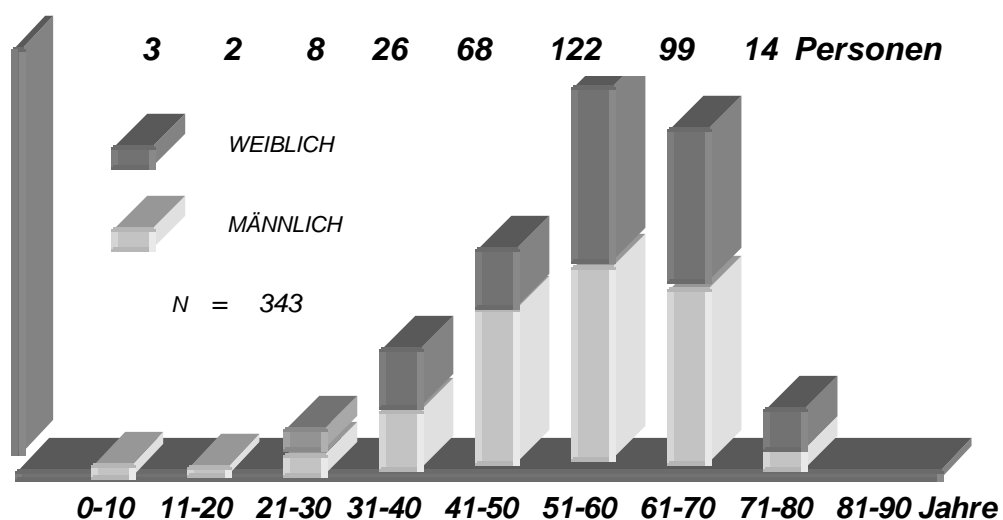


Abb.1 Alters- und Geschlechtsverteilung bei Glioblastomen (Neurochirurgische Universitätsklinik Düsseldorf 1963-1982) nach Schirmer (1994). Modifiziert.

Unterschiedliche epidemiologische Studien weisen darauf hin, daß die Inzidenz von Hirntumoren mit steigendem Alter zunimmt. So belegen Auswertungen des Florida Cancer Data System (FCDS) eine Zunahme an primären Hirntumoren bei 65-jährigen und älteren Personen von 23.4% über einen mehrjährigen Zeitraum. Tumore anderen Ursprungs weisen demgegenüber lediglich eine Zunahme von nur 7.6% auf. Bei Personen von 20-45 Jahren (Werner et al.; 1995) konnte keine signifikante Zunahme von Hirntumoren nachgewiesen werden. Ebenso berichten Davis et al. (1998) über einen Rückgang von GBM bei jüngeren Patienten, gleichzeitig hingegen jedoch eine Zunahme dieser Tumore bei Patienten ≥ 65 Jahre (s. Tab.2). Epidemiologische Studien von Kallio et al. (1991) zeigen gleichfalls einen Anstieg der Inzidenz von Gliomen bei Männern ≥ 64 Jahre von 0.09 in den Jahren 1953-1957 auf 8.0 in den Jahren 1980-1984. Da mit einem weiteren Ansteigen des Lebensalters zu rechnen ist, wird sich diese Tatsache zukünftig in einem weiteren Ansteigen der Zahlen widerspiegeln.

<i>Tumor-Typ</i>	Alters- gruppe (Jahre)	Durchschnittsalter bei Diagnosestel- lung (Jahre)			Änderung des Durch- schnittsalters (Jahre)
		1973-80	1981-85	1986-91	
GBM	£ 20	13.3	13.2	10.5	-2.8
GBM	³ 65	71.8	72.6	73.1	+1.3

Tab.2 Änderung des Durchschnittsalter von GBM-Patienten bei Diagnosestellung zu verschiedenen Zeitperioden (aus: Davis et. al., 1998).

1.2 Therapie von Hirntumoren: gestern, heute, morgen

Vor 115 Jahren – am 25. November 1884 - wurde erstmals unter (vergleichsweise) aseptischen Kautelen ein Hirntumor exstipiert. Bei diesem Tumor, der in der Nähe der 3. oberen Rolando-Fissur lag, wird es sich wahrscheinlich um ein

Oligodendrogliom gehandelt haben (neuroepithelialer Grad II Tumor nach WHO-Klassifikation). Obwohl die Operation komplikationslos verlief und der Tumor entfernt werden konnte, verstarb der Patient 28 Tage später; allerdings an einer eitrigen Meningitis. In den 30er und 40er Jahren unseres heutigen Jahrhunderts wurden die Möglichkeiten der chirurgischen Intervention durch Cushing weiter optimiert und zur Behandlungsmethode der Wahl bei der Therapie der Hirntumoren.

Obwohl sich unser Wissen um die Funktionen und Leistungen des Gehirns ständig erweitert und verbessert, hochsensible diagnostische Methoden erfunden wurden (Hirnszintigraphie, MRT, CT, SPECT Angiographie u.a.) und eine histologische Einteilung der verschiedenen Tumore eingeführt wurde, konnten die therapeutischen Möglichkeiten bislang nicht in dem gleichen Maße Schritt halten. Die chirurgische Intervention - in Kombination mit postoperativer Bestrahlung – stellt weiterhin das therapeutische Mittel der Wahl - oder zumindest den Hauptpfeiler einer multimodalen Therapiestrategie - dar. Heuser (1990) beschreibt eine durchschnittliche postoperative Überlebenszeit von 6 Monaten; bei alleiniger Operation ohne nachfolgende adjuvante Therapie. Mittels postoperativer Radiotherapie wird oftmals eine Überlebenszeit-Verlängerung von weiteren 6 Monaten (Bamberg et al., 1996; Heuser, 1990) erzielt. Eine externe fraktionierte Strahlen-Therapie gehört daher zur multimodalen Standardbehandlung bei GBM-Patienten. Aus klinischen Untersuchungsreihen der Brain Tumor Study Group (BTSG)/Brain Tumor Cooperative Group (BTCG) (Walker, 1980; Shapiro, 1989) sowie der Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (Chang, 1983) ist bekannt, daß mittels externer fraktionierter Strahlen-Therapie, die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit GBM und Anaplastischem Astrozytom (AA) signifikant verlängert werden kann (Stea et al., 1994). Nichtsdestotrotz bleibt die Prognose des GBM weiterhin denkbar schlecht und die Überlebensraten sind noch immer extrem kurz (Tab. 1). Durmaz et al. (1997) berichten über eine mittlere Überlebenszeit von 53 Wochen, wobei hier kein Patient länger als 3 Jahre überlebte; lediglich 8.6% seiner Patienten lebten überhaupt länger als 2 Jahre. Quigley et al. (1995) fanden ebenfalls eine mittlere Überlebenszeit von nur wenigen Monaten. Abhängig von der Radikalität der Resektion lassen sich allerdings sowohl eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit

(76 Wochen), als auch eine Verbesserung der postoperativen Lebensqualität erzielen (Daneyemez et al., 1998).

Ammirati et al. (1987) fanden bei Patienten mit einer Totalresektion postoperativ einen verbesserten Karnofsky-Index, im Vergleich zu jenen Patienten, denen nur eine subtotale Resektion zukam. Die Patienten mit Totalresektion verbrachten nach der Operation eine signifikant längere Zeitspanne in einer unabhängigen Lebensweise und somit auch mit einer verbesserten Lebensqualität.

Weitere adjuvante und neoadjuvante Therapien, wie z.B. Chemo-, Immuno-, Hyperthermie- und Photodynamische-Therapie wurden eingeführt, konnten die Prognose des GBM jedoch nicht deutlich verbessern.

Bei den Chemotherapeutika hat sich vor allem das Nitrosoharnstoffderivat BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) als wirksam erwiesen. Fine et al. (1993) und Heuser (1990), wie auch Chamberlain (1998) berichten über einen positiven, wenn auch eher adjuvanten Effekt dieser Substanz bei malignen Gliomen. So lebten laut in einer Studie von Heuser, nach 2 Jahren noch 30% der mit BCNU behandelten Patienten. Bei über der Hälfte (13/23) dieser Patienten lag ursächlich allerdings ein AA vor, das *per se* eine deutlich bessere Prognose aufweist. Die Ergebnisse dieser Studie dürfen bei der Therapie des GBM daher nicht überbewertet werden. Nach Gundersen (1998) kommt der adjuvanten Chemotherapie ein nachgewiesener Nutzen lediglich bei der Behandlung der Anaplastischen Gliome zu, nicht hingegen bei der Therapie von Glioblastomen.

Photodynamische Therapie-Strategien mit intravenösen Porphyrin-Photosensitizern zeigten - abhängig vom Patientengut - geringfügig verbesserte Überlebensraten bei Patienten mit malignen Gliomen (Muller und Wilson, 1996). Auch hier profitierten eher Patienten mit AA; GBM-Patienten zeigten in dieser Studien ein 2-Jahres-Überleben von 0% (!). Die Photodynamische Therapie scheint daher in erster Linie einer ausgewählten Patientenschaft – mit einer bestimmten Tumorart - vorbehalten zu sein.

Alles in Allem bedeutet die Diagnose eines Hirntumors oftmals für den Betroffenen eine sehr ernste Prognose, bei der die multimodale Intervention keine endgültige Heilung bringen, sondern lediglich eine mehr oder minder kurzfristige Besserung für den Patienten bedeuten kann. So haben sich z. B. die Überlebenszeiten nach Diagnosestellung eines GBM, trotz ständig verbesserter

Operationsmethoden, in den letzten fünf Jahrzehnten nicht dramatisch verbessert und bedeuten heute noch immer für den Betroffenen den sicheren Tod meist innerhalb von ein bis zwei Jahren.

1.3 Grundzüge der Tumorentstehung

Um einen Tumor therapeutisch besser angehen zu können, ist es wichtig, ihn in seiner Entstehung zu verstehen. Therapieansätze könnten so eventuell bereits in diesem Stadium greifen. Mit unserem heutigen Wissen um die Pathologie und Biologie von Tumoren besteht daher Grund für Optimismus, insbesondere durch die Entwicklung und die Fortschritte, die in der Molekularbiologie gemacht wurden. Die Verbesserung der molekulargenetischen Techniken sowie das fortschreitende Wissen auf diesem Gebiet in den vergangenen 10 bis 20 Jahren, führte zu der Erkenntnis, daß verschiedene genetische Alterationen im Genom einer (Tumor-)Zelle an ihrer Entartung beteiligt sind. Dies hat zur Formulierung zweier in Wechselbeziehung stehender Konzepte der Onkogenese geführt.

1. Entartung, wie auch Progression oder Tumorwachstum sind wahrscheinlich das Resultat einer inadäquaten Expression genkodierter Proteine, welche die Zelldifferenzierung und Proliferation beeinflussen; diese „überaktiven“ Gene werden Onkogene genannt (definitionsgemäß sind Onkogene zur insertionellen Kanzerogenese befähigt; es handelt sich um DNA-Sequenzen, die für ein Protein kodieren, welches eine Zelle transformieren kann, oder fähig ist bei Tieren Krebs zu induzieren); hierbei handelt es sich um Varianten normaler Zellgene, auch Proto-Onkogene genannt (Varmus, 1984). Zu den Onkogenen zählen u.a. Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, wie z.B. der Platelet-Derived Growth Factor-Receptor (PDGFR; *c-sis*) und der Epidermal Growth Factor-Receptor (EGFR; *c-erbB1*), die Tyrosin-spezifischen Protein-Kinasen – z.B. *src*, die Guanin-bindenden Proteine (G-proteins; *ras*) u.a. Die Beziehung zwischen Auftreten der Aktivierung bestimmter Onkogene und der Entstehung von Tumoren des

ZNS ist teilweise bekannt. So sind bei Astrozytomen molekulargenetische Veränderungen nachgewiesen, die während der Progression zum GBM auftreten und vermutlich Anteil an der neoplastischen Initiierung, der Progression und/oder des neoplastischen Wachstums haben. An dieser Stelle sei auf den Abschnitt 1.7 dieses Kapitels verwiesen.

2. Es gibt eine Gruppe von Genen, die als sog. Tumor-Suppressorgene bezeichnet werden. Es handelt sich hierbei um Gene, deren „antikanzergene“ bzw. protektive Funktion solange eines der beiden Allele funktionsfähig. In diesem Sinn handelt es sich bei Verlust oder Mutation dieser Gene im Rahmen der Tumorentstehung um einen rezessiven Prozeß. Ein Beispiel für den hier zugrundeliegenden Mechanismus bietet die Pathogenese des Retinoblastoms, welches in zwei möglichen Varianten, als familiäre (hereditäre) oder sporadische Form, auftreten kann (Friend et al., 1988). In diesem Zusammenhang soll hier aber lediglich auf die „two-hit“ Theorie von Knudson (1971) hingewiesen werden.

An dieser Stelle erwähnt werden sollte das Tumorsuppressorgen *p53*, dessen Mutation oder Verlust eine der frühesten nachweisbaren genetischen Alterationen z. B. in der Tumorgenese von Astrozytomen darstellt (James et al., 1989; von Deimling et al., 1992a). Konsequenzen dieser Mutation sind mitunter die (in)direkte Herunter-Regulierung des Angiogenese-Inhibitors GD-AIF (glioma derived angiogenesis inhibitory factor), oder die Hochregulierung des Promotors von FGF (Fibroblast Growth Factor) in menschlichen Gliom-Zelllinien. Hierbei handelt es sich um einen potenten mitogenen und angiogenetischen Faktor, der normalerweise durch die physiologische *p53*-Form (*p53-wild type*) herunterreguliert wird (Ueba et al., 1994).

1.4 Problemstellung

Experimentelle Tumormodelle an Tieren haben erheblich dazu beigetragen, zu einem Verständnis zu gelangen, welche Faktoren und/oder molekulargenetischen Veränderungen im ZNS zu einer Transformierung von Zellen führen können, oder zumindest an ihr beteiligt sind.

Transplazentar mittels Harnstoffderivate induzierte experimentelle Tumore der Ratte lieferten hierzu interessante Ergebnisse, so z. B. die Entdeckung des *neu*-Gens in NEU-induzierten Schwannomen der Ratte (Schechter et al., 1984), welches homolog zum humanen Gen *ErbB-2* ist (auch *c-neu* oder HER-2 genannt) und häufig in Mamma- und Ovarial-Karzinomen amplifiziert wird (Hynes, 1993). Das *ErbB-2/Neu*-Gen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) (*c-erbB2*) (Bargmann et al., 1986) mit einem Molekulargewicht von 185 kDa, welche ihrerseits wiederum eine hohe Homologie zum Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor-Receptor, EGFR) (Coussens et al. 1985) aufweist (s. Fig. 1).

Die Bedeutung des EGF-Rezeptors für die Tumorentstehung bei glialen Tumoren liegt darin, daß ca. 40% der menschlichen Glioblastome eine Amplifikation dieses Rezeptors aufweisen (Leon et al. 1994).

Um sowohl die Rolle, die der EGF-Rezeptor in menschlichen GBM spielt, besser verstehen zu können als auch die experimentelle Erforschung neuer Therapieansätze zu testen, spielen Modellsysteme, wie die der experimentell induzierten Tumoren der Ratte eine bedeutende Rolle. Im folgenden Abschnitt soll nun zunächst das benutzte Tumormodell sowie die Genetik und Biochemie des Rezeptors und seiner Aktivierung beschrieben werden.

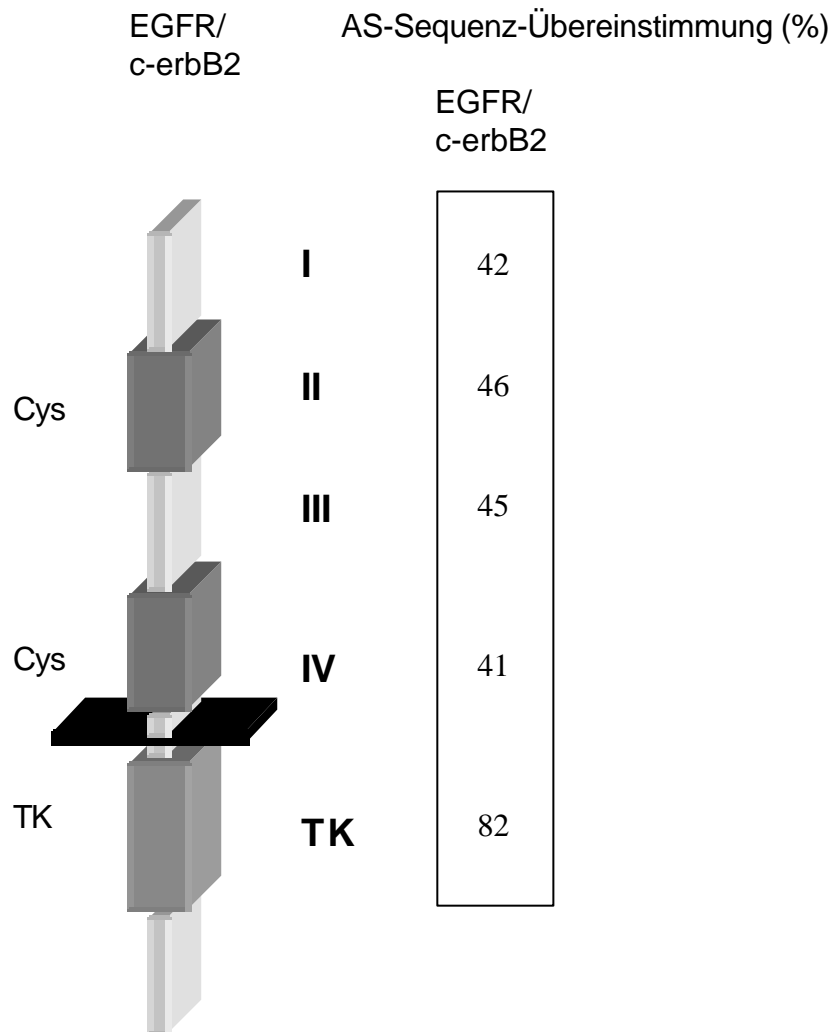


Fig. 1 Schematische Darstellung der AS-Sequenz-Übereinstimmung (in Prozent) verschiedener Domänen des EGF-Rezeptors und von c-erbB2 (*Cancer Topics*, 1992 Vol.8.).

1.4.1 Chemische Karzinogenese

Methylcholanthren war die erste Substanz, die von Seligmann und Sher (1939) zur experimentellen Erzeugung von Tumoren des Nervensystems an Mäusen verwandt wurde. Methylcholanthren stellte sich in den folgenden Jahren als eine Substanz heraus, die mit großer Sicherheit Tumore des ZNS bei Mäusen induzierte (Tansley und Wilson, 1947). Allerdings war es einerseits noch notwendig, das verwendete karzinogene Agens mittels Pellet-Implantation direkt in das Cerebrum des Versuchstieres einzubringen. Andererseits zeigten das Methylcholanthren sowie die ebenfalls verwendeten Substanzen Dibenzanthrazen und Benzpyren - allesamt

karzinogene Kohlenwasserstoffe - lediglich eine hohe Wirksamkeit an Mäusen; an Ratten kam es zu einer weniger gut steuerbaren Induktion von ZNS-Tumoren (Sweet und Bailey, 1941).

Dieses Dilemma beendeten Maggee und Barnes 1956 durch die Einführung einer neuen Substanzgruppe, den N-Nitrosoverbindungen (Nitrosamide).

Dem bei reaktiven Zerfall von N-Nitrosoverbindungen entstehenden Diazoalkan kommt hier vermutlich die kanzerogene Wirkung zu (Druckrey et al., 1968). Die erste bedeutende Substanz stellte das Dimethylnitrosoamin dar, welches nicht mehr mittels Implantation zugeführt werden mußte, sondern resorptiv aufgenommen werden konnte.

Ein weiterer Durchbruch gelang mit der Substanz Äthylnitrosoharnstoff (ÄNH), welcher auf transplazentaren Weg eine Tumorgenese induzieren konnte (Druckrey et al., 1968). Um bei der Nachkommenschaft von tragenden Ratten neurogene Tumoren zu induzieren, genügt bereits eine einmalige intravenöse ÄNH-Applikation, welche ohne toxische oder kanzerogene Auswirkung auf das Muttertier bleibt. Die entsprechende Methylverbindung erwies sich bei ähnlicher karzinogener Wirksamkeit als weitaus toxischer (LD 50 des ÄNH beträgt 240 mg/kg Körpergewicht nach oraler oder intravenöser Gabe gegenüber 100 mg/kg Körpergewicht bei Methylnitrosoharnstoff (MNH)). ÄNH-Gabe um den 20. Tag post coitum beim Muttertier, oder am 1. Tag post partum beim Jungtier führt in einem hohen Prozentsatz zu malignen Schwannomen im intrakraniellen Teil des Nervus trigeminus (Druckrey et al., 1966). Eine Erklärung, warum der Applikationszeitpunkt eine so wichtige Rolle bei der Gabe von N-Nitrosoverbindungen spielt, lieferte Magee (1968).

Er fand, daß 7-Methylguanin als Folge einer Methylierung nur bei solchen Feten einer Ratte gebildet wird, die am 21. Tag der Gestation einem radioaktiv markierten Dimethylnitrosamin ausgesetzt waren. Dies liegt wiederum darin begründet, daß die zur Dealkylierung erforderlichen Hydroxylasen erst kurz vor bzw. nach dem Geburtstermin bei der Ratte gebildet werden. Die un- und neugeborenen Tiere befinden sich daher zu diesem Zeitpunkt in einer besonders vulnerablen Periode.

Durch die Alkylierung von Guanin an der O⁶ Position kommt es zu einem dauerhaften DNA-Schaden (Goth und Rajewski, 1974; Marginson und Kleihues, 1975),

im Sinne einer anormalen Basenpaarung (G-T anstatt G-C). Was nun folgt, kann man sich folgendermaßen vorstellen: die Stabilisierung dieser abnormen Basenpaarung führt zu einer Punktmutation, welche z.B. die Aktivierung des *Ras*-Onkogens nach sich ziehen kann (Zabel et al., 1985). Ähnlich kommt es in mit ÄNH behandelten Tieren durch Punktmutation zu einer Aktivierung des *neu* Gens in ein dominantes Onkogen.

Mennel und Groneck (1977) etablierten von diesen chemisch-induzierten Tumoren sog. Transplantations-Tumore und *in-vitro*-Systeme, um die zum Teil sehr langen Induktionszeiten zu umgehen. Eben solche Transplantat-Tumore wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und untersucht.

Von den transplazentar mit ÄNH induzierten Hirntumoren wurden Tumorlinien abgeleitet, die entweder durch intrazerebrale Tier-zu-Tier-Passage oder *in-vitro* kultiviert wurden. Nach etwa 12 Passagen stellen sich die Transplantat-Tumore als entdifferenzierte Gliome dar. Die relativ kurze Induktionszeit und die Reproduzierbarkeit der morphologischen Befunde machen dieses Modell geeignet für Therapieversuche. Allerdings scheint sich noch eine Veränderung der Suszeptibilität gegenüber therapeutischen Ansätzen einzustellen, die allerdings nicht mit Veränderungen im histologischen Erscheinungsbild einhergeht.

Es wurde bereits eingangs darauf hingewiesen, daß die molekulargenetische Untersuchung humaner GBM in einem hohem Prozentsatz eine Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens – und anderer z.B. Zell-Zyklus-steuernder Gene – zeigte, weshalb im folgenden Kapitel kurz auf die RTK – zu denen der EGF-Rezeptor gezählt wird – eingegangen werden soll.

1.4.2 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Signaltransduktion

Um eine kontrollierte Steuerung verschiedener Funktionen wie Wachstum, Zelldifferenzierung oder auch reparativer Vorgänge in einem vielzelligen Organismus zu gewährleisten, bedarf es verschiedener (Polypeptid-) Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren.

Hierbei handelt es sich unter anderem um Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, deren Aufbau und Funktion erläutert werden soll. Die RTK werden aufgrund struktureller Unterschiede in Subklassen unterteilt (Schlessinger und Ullrich, 1992).

Vertreter dieser Subklassen sind z.B.:

Epidermal Growth Factor-Receptor (**EGFR**) Platelet Derived Growth Factor-Receptor (**PDGFR**) Fibroblast Growth Factor-Receptor (**FGF-R**) Insulin-Receptor (**IR**) Insulin-like Growth Factor-Receptor-1 (**IGFR-1**) Nerve Growth Factor-Receptor (**NGFR**) Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor (**VEGFR**) Macrophage Colony Stimulating Factor-Receptor (**M-CSFR**)

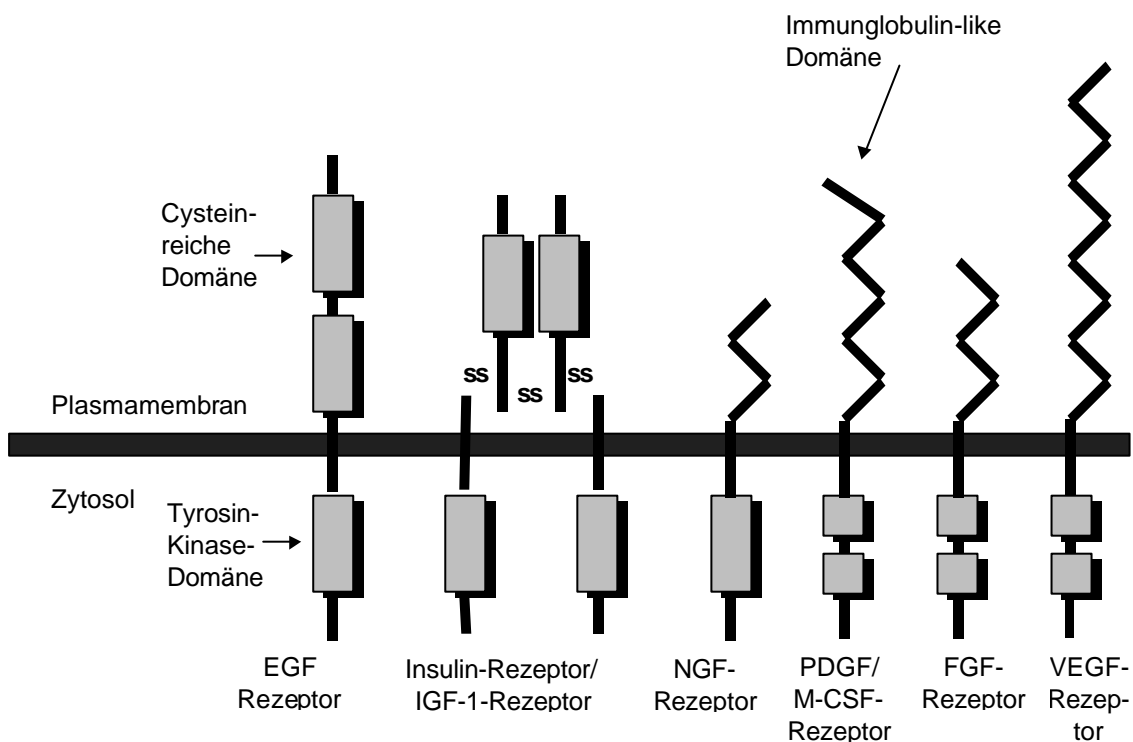


Abb.2 Die sechs Unterfamilien der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
Einteilung der RTK in Subfamilien aufgrund struktureller Unterschiede; angegeben sind jeweils nur ein oder zwei Vertreter jeder Subfamilie (EGFR = Epider-

mal Growth Factor Receptor, IGF-R = Insulin-like Growth Factor Receptor, NGF-R = Nerve Growth Factor Receptor, PDGF-R = Platelet Derived Growth Factor Receptor, M-CSF-R = Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor, FGF-R = Fibroblast Growth Factor Receptor, VEGF-R = Vascular Endothelial Growth Factor Receptor).

In die Subklasse/Unterfamilie I, zu der auch der EGF-Rezeptor gehört, zählen desweiteren z.B. noch die ErbB-2/Neu, ErbB-3 und ErbB-4 Genprodukte.

Die Rezeptorproteine bestehen aus einer glykosylierten extrazellulären Domäne (extra-cellular domain, ECD), einer hydrophoben transmembranen Domäne (transmembrane domain; TMD) und einer katalytischen, zytoplasmatischen Domäne (intracellular domain, ICD). Beim EGF-Rezeptor besteht die ECD aus zwei cysteinreichen Regionen, welche die Liganden-bindende Region flankieren (Lax et al., 1988; Schlessinger und Ullrich, 1992). Die TMD setzt sich aus 23 -25 hydrophoben Aminosäuren zusammen und stellt die Verbindung zwischen extra- und intrazellulärer Domäne dar. Die ICD besitzt die bereits erwähnte Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der zytosolischen Signalübertragung spielt.

Lemmon und Schlessinger (1994) haben die funktionelle Aktivierung von RTK am EGF-Rezeptor untersucht. Die bedeutende Frage war hier, wie es nach der Bindung eines Liganden am Rezeptor - trotz räumlicher Trennung durch die Zellmembran - zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase kommen kann.

Der erste Schritt der Aktivierung der RTK ist die Bindung des Liganden an extrazelluläre Formationen, die durch spezielle Faltung der Cystein-Gruppen entstehen. Diese Konformationsänderung bedingt einerseits eine ATP-Bindung an einer definierten, hoch konservierten Region des Moleküls, andererseits kommt es zu einer Veränderung der Verteilung der EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche - von einem Zustand von verstreuten Rezeptoren in einen Zustand von dimerisierten oder gruppierten Rezeptoren (Schlessinger, 1988).

Zwei Wege, die zu einer Dimer-Bildung führen könnten, werden diskutiert. Einerseits könnte ein bivalenter Ligand befähigt sein gleichzeitig zwei (verschiedene) Rezeptoren zu binden und hierdurch die Dimerisierung ermöglichen. Ebenfalls denkbar ist eine durch die Ligandbindung induzierte Konformationsänderung, welche die aktive, dimere Form ermöglicht und stabilisiert. Weiterhin denkbar wäre die Möglichkeit (Basu et al. 1989) einer Liganden-induzierten Überführung eines ruhenden, inaktiven, monomerischen in einen aktiven monomerischen Rezeptor.

Das Modell der Hetero/Homo-Dimerisierung würde - abhängig von der Struktur des Liganden - die Kombination unterschiedlicher Rezeptormoleküle ermöglichen. Denkbare Folge wäre eine Steigerung der Vielfalt der Signalreize (Lemmon und Schlessinger, 1994).

Die Heterodimerisierung der extrazellulären Domäne erhöht einerseits die Anzahl möglicher Ligand - Rezeptor - Interaktionen, andererseits wird durch die Dimerisierung auf der zytoplasmatischen Seite die Variationsbreite der SH2-Domänen enthaltenen Signalmoleküle, die an diese Rezeptoren binden können, vervielfältigt (s.a. Abb.3). Bei den SH2-Domänen handelt es sich um Domänen mit Affinität zu den phosphorylierten Autophosphorylierungsstellen der Rezeptoren; hoch konservierte nicht-katalytische Domänen, welche „src homology domains“ 2 und 3 (SH2 und SH3) genannt werden, da sie erstmals im src-Genprodukt pp60src nachgewiesen wurden (Schlessinger, 1993).

Böni-Schnetzler und Pilch (1987) fanden außerdem, daß dimerisierte Rezeptoren eine höhere Bindungsaffinität für Wachstumsfaktoren besitzen als monomere Rezeptoren.

Desweiteren führt die Bindung des Epidermalen Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor zu einer Veränderung der enzymatischen Eigenschaften der Tyrosin-Kinase-Aktivität gegenüber exogenen Substraten, was sich durch einen Abfall der K_m für die Substrat-Phosphorylierung und einem Anstieg von V_{max} der Reaktion zeigt (Carpenter, 1987; Gill et al, 1987).

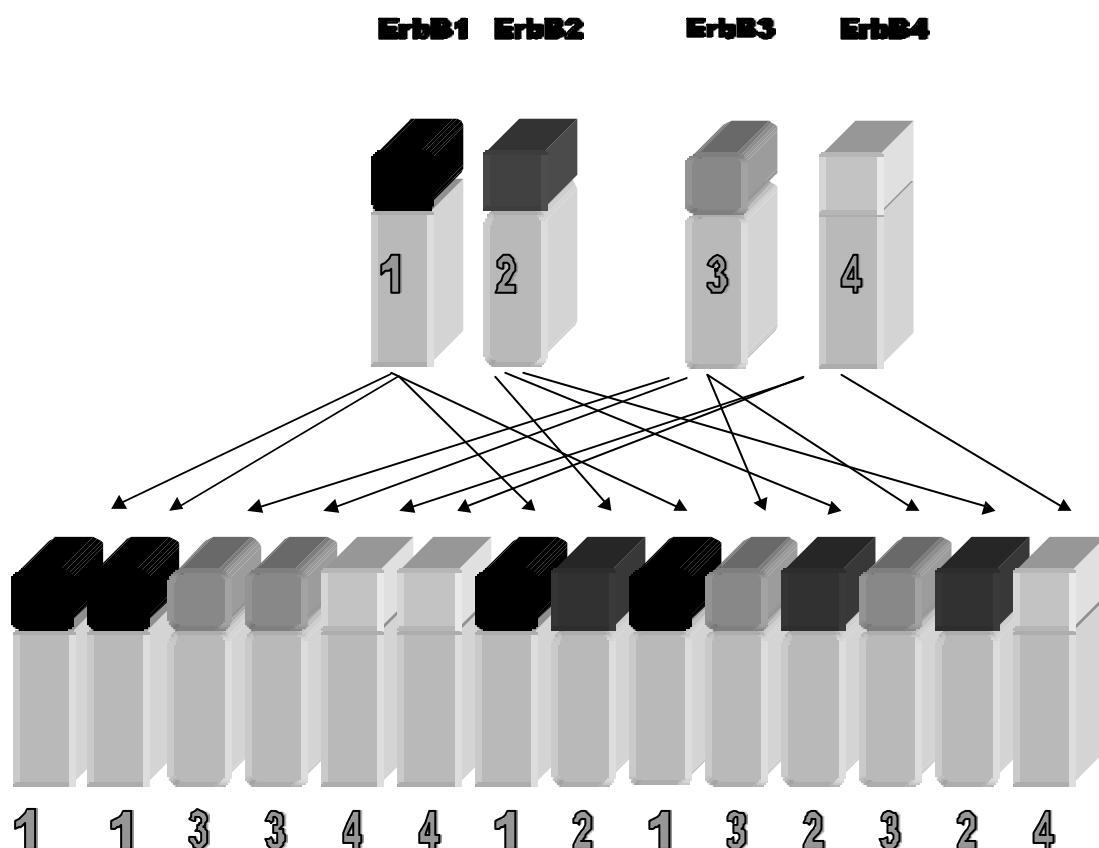


Abb. 3 Homo- und Heterodimerisierung der Rezeptorvarianten der EGF-Rezeptor-Familie.
Obere Reihe: Die vier bekannten Mitglieder der EGF-Rezeptor-Familie. Untere Reihe: Die sieben bekannten von zehn denkbaren Möglichkeiten (nach Lemmon und Schlessinger, 1994)

Die Zusammenlagerung des EGF-Rezeptors zu Dimeren ermöglicht die gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosin-Reste beider zytoplasmatischer Domänen (Honegger et al., 1990). Phosphatgruppen werden von ATP auf Tyrosin-Seitenketten, sowohl des Rezeptors selbst, als auch auf andere spezifische zelluläre Proteine transferiert (Di Fiore et al., 1990). Diese reversible Phosphorylierung ist die Strategie der Zelle zur Signaltransduktion. Die transmembrane Domäne bleibt während dieses Vorgangs unverändert und dient lediglich der Verbindung zwischen extra- und intrazellulärer Domäne sowie der Verankerung in der Zellmembran.

In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, daß eine abnormale Wachstumsregulation z. B. in malignen astrozytischen Neoplasien, u.a. in engem Zusammenhang mit einer Amplifikation einzelner Gene und konsekutiv vermehrter Expression von RTK steht. So weisen maligne Astrozytome und GBM in einem hohem Prozentsatz eine Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens auf; ebenfalls beobachtet werden konnte eine verstärkte Expression von EGF-Rezeptor (Kristt et al. 1993; Kristt und Yarden, 1996).

Einige der Substratmoleküle, die an die Phosphotyrosine des aktivierten Rezeptors binden, sind in letzter Zeit kloniert und biochemisch charakterisiert worden. Große Bedeutung haben hier jene bereits erwähnten Moleküle erlangt, die über Domänen mit Affinität zu den phosphorylierten Autophosphorylierungsstellen der Rezeptoren verfügen; unterschiedlich zwar in ihren Strukturen und Funktionen, besitzen sie jedoch gemeinsam zwei hoch konservierte nicht-katalytische Domänen (SH2 und SH3) (Schlessinger, 1993).

Die SH2-Domäne erkennt die Phosphotyrosine des Rezeptors und befähigt die Proteine sich an die aktivierte RTK zu binden. Beteiligte Signal-Proteine sind das GTPase-activating protein (GAP) und die Phospholipase-C- γ (PLC- γ), die den Inositol-Phospholipid-Signalweg einleitet (Margolis et al., 1990). Ebenso reagiert

das GBR2-Protein, das über SH2- und SH3-Domänen verfügt, mit aktivierten Rezeptoren der EGF-Rezeptor-Familie.

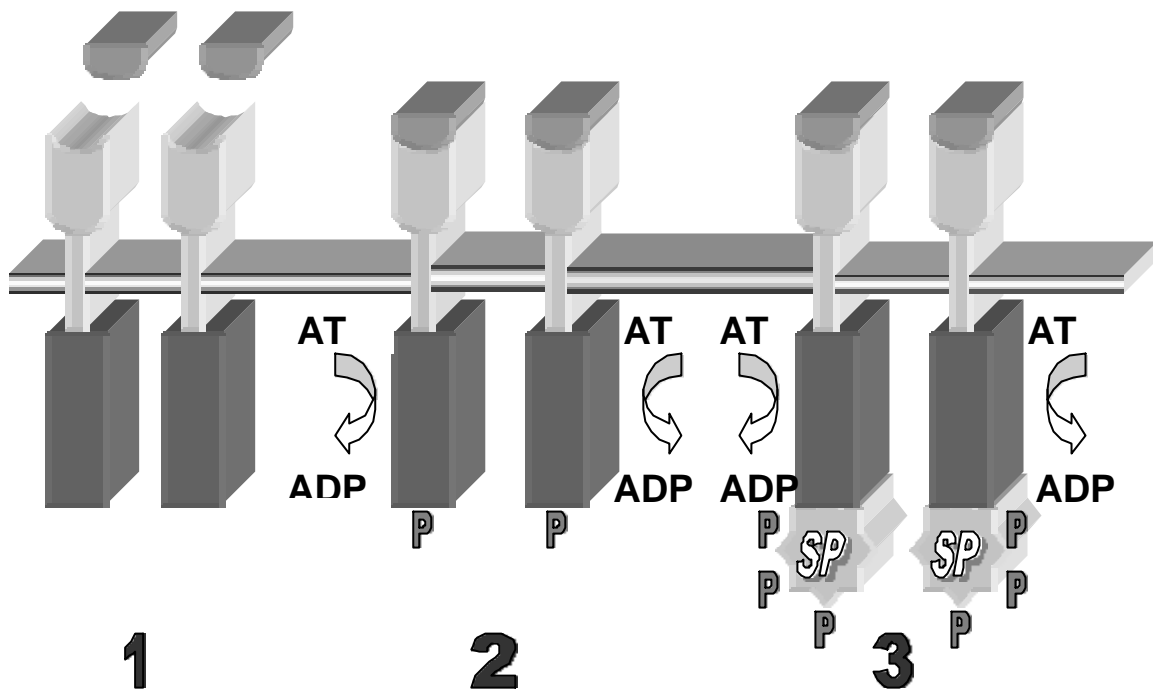


Abb. 4 Rezeptoraktivierung. Extrazelluläre Liganden-Bindung (1) führt zur Rezeptor-Dimerisierung (2) und konsekutiver Autophosphorylierung (2). Im Anschluß hieran phosphorylieren die aktivierten Rezeptor-Komplexe (3) die zyttoplasmatischen Substrat-Proteine (SP), welche dann die spezifische zelluläre Reaktion initiieren.

Über diese Phosphorylierung besteht somit eine direkte Verbindung der RTK- und des *Ras*-vermittelten Signalweges in der Zelle (Schlessinger, 1993).

Das *Ras*-Protein stellt ein weiteres Verbindungsglied in der intrazellulären Signalkaskade dar, welches durch die RTK aktiviert wird; *Ras* gehört in die Superfamilie der monomerischen GTPasen und wird durch Binden von GTP bzw. GDP aktiviert bzw. inaktiviert. Bindungsstelle für GTP am *Ras*-Molekül sind die Aminosäuren 12, 13 und 61, welche bei krebserzeugenden Mutationen häufig verändert sind. *Ras* unterstützt die Signalübermittlung der RTK zum Zellkern sowie die Stimulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung.

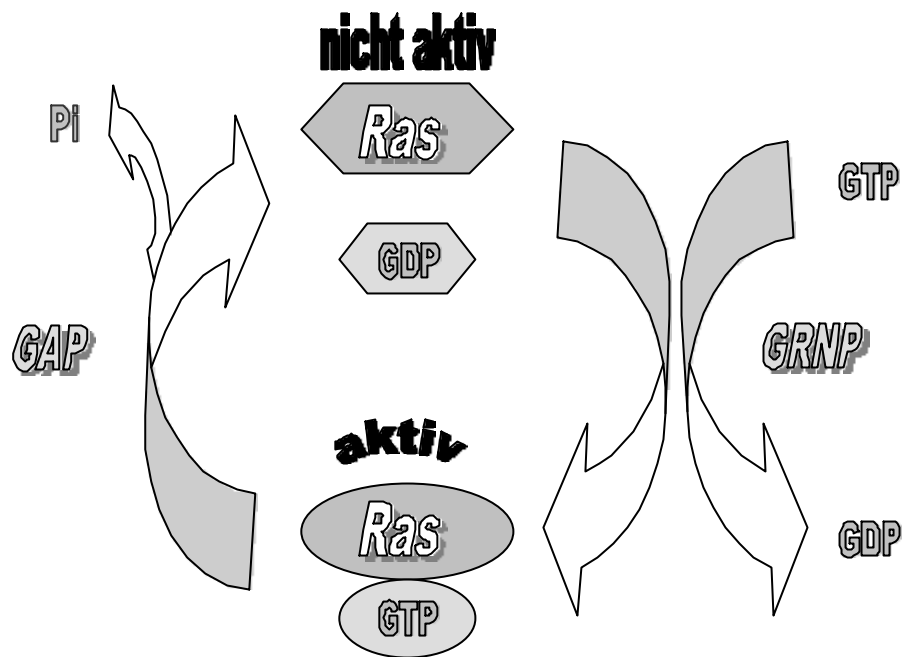


Abb. 5 Regulation der Ras-Aktivität. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) inaktivieren *Ras*, durch Hydrolyse des gebundenen GTP. Die Guanin-Nucleotid-Releasing-Proteine ihrerseits, aktivieren *Ras*. Diesem Prozeß vorgeschaltet ist die RTK, die *Ras* entweder durch Aktivierung der GNRPs oder Inaktivierung der GAP aktivieren kann.

Guha et al. (1997) konnten zeigen, daß in humanen Astrozytom-Zelllinien erhöhte *Ras*-Konzentrationen zu einer gesteigerten Proliferationsrate führen. Durch Blockade von *Ras* durch einen Farnesyl-Transferase-Inhibitor oder mittels Expression einer *Ha-Ras-Asn17*-dominant-negativen Mutation konnte in-vitro eine Proliferationsabnahme in den humanen Astrozytom-Zelllinien herbeigeführt werden. Dies spricht dafür, daß z.B. Proliferationssignale in malignen humanen Astrozytomen unter anderem über den *Ras*-Signalweg vermittelt werden.

Der Vorgang der Proliferation und Differenzierung kann, außer durch gegen *Ras* gerichtete Antikörper, ebenfalls durch Inaktivierung der GAP oder Aktivierung der guanine nucleotide release proteins (GNRP's) initiiert werden. Durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP ist die Aktivierung des *Ras*-Proteins zeitlich limitiert. Um aber die Zelle zur Proliferation oder Differenzierung zu stimulieren bedarf es stabilerer Signalprotein-Formen. Bei diesen stabileren Protein-Zustandsformen handelt es sich um spezielle Serin/Threonin-Kinasen, von denen einer Gruppe ei-

ne besondere Rolle zukommt. Diese mitogen-activated protein (MAP) kinases (auch *extracellular-signal-regulated kinases (ERKs)*) bezeichneten Kinasen müssen - um ihre volle Aktivität erreichen zu können - sowohl am Serin, als auch am Threonin phosphoryliert werden.

Die Protein-Kinase, die das bewerkstelligt ist die sog. MAP-Kinase-Kinase, welche ihrerseits durch Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase aktiviert wird. Die MAP-Kinase-Kinase-Kinase wiederum wird durch die Bindung von *Ras* aktiviert.

Wie aber bereits oben erwähnt, stellt die MAP-Kinase nur eine stabilere Zustandsform dar, die benötigt wird um das Rezeptorsignal durch das Zytosol zum Zellkern und somit zur DNA zu transportieren. Hier phosphoryliert die MAP-Kinase einen SRF (serum response factor)/ELK-1 genannten Komplex, welcher in der Regulator-Region des sog. *fos*-Gens liegt und somit letztlich die Transkription des *fos*-Gens betreibt. Zusätzlich kann die MAP-Kinase das Jun-Protein phosphorylieren, welches sich mit dem soeben entstandenen *fos*-Gen-Produkt zu einem *active gene regulatory protein*, AP-1 genannt, formiert. Dessen Rolle bei der Stimulierung der Zellproliferation konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden.

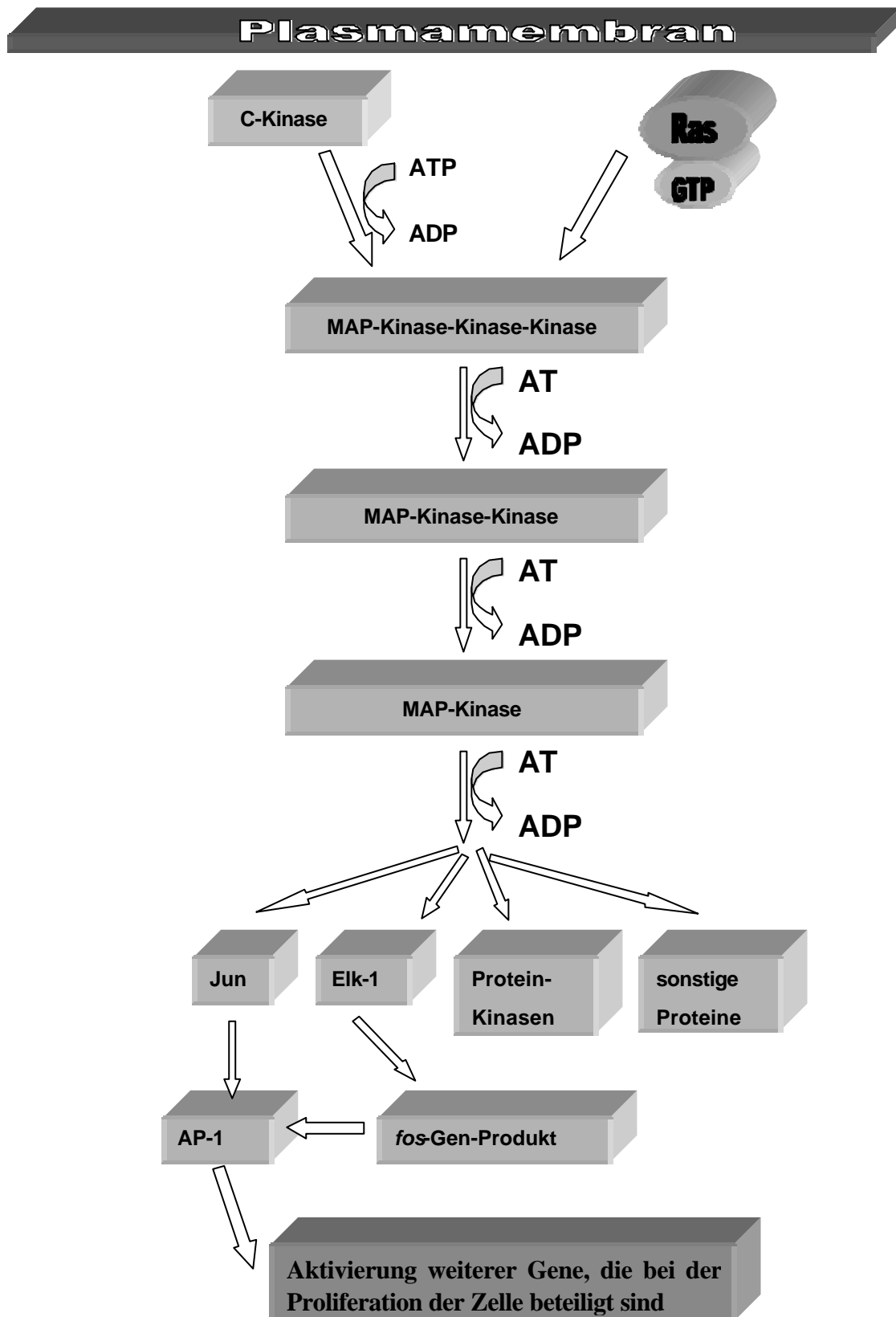


Abb. 6 *Ras* und C-Kinase aktivieren die Serin/Threonin-Phosphorylierungs-Kaskade. Binden von aktiviertem *Ras* führt zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (häufig eine Serin/ Threonin-Kinase).

Es ist ersichtlich, daß sowohl eine veränderte Expression wie auch eine strukturelle Veränderung unterschiedlicher Teile dieser Signaltransduktionskette durch unkontrolliertes Wachstum oder Zelldifferenzierungsdefekte zu einer tumorösen Entartung führen kann. Ein detailliertes Wissen der möglichen Zusammenhänge abnormer Signaltransduktionswege und ihrer möglicherweise konsekutiven Erkrankungen ist daher eine unerläßliche Grundlage für pathogeneseorientierte Therapien.

1.5 EGF und EGF-Rezeptor

1.5.1 EGF

1962 wurde von Cohen in der Submandibulardrüse von Mäusen ein Protein entdeckt, welches zu vorzeitiger Lidöffnung und Zahnaussprossung führte, wurde ein Extrakt aus o.g. Drüse neonatalen Ratten injiziert. 1972 konnte von Savage ein 53 AS großes Protein aus der Submandibulardrüse von Mäusen extrahiert und sequenziert werden. Savage et al. (1972) zeigten, daß dieses Peptid (EGF) neben den das Wachstum fördernden Effekten, ebenfalls den Glukose- und Aminosäure-Uptake der Zellen stimulierte.

Die Sequenz-Analyse des EGF zeigte ein 53 AS großes Protein, dessen 6 konservierte Cystein-Reste über Kreuzbindung zur Ausbildung dreier Peptid-Loops innerhalb des Proteins führen (Savage et al., 1973).

Das kodierende Gen für den Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) liegt beim Menschen auf Chromosom 4 (Zabel et al., 1985; Morton et al., 1986) und bei der Maus auf Chromosom 3 (Zabel et al., 1985); es ist 120 kb groß und besteht aus 24 Exons (Mensch).

EGF führt neben der Beschleunigung des Lidöffnens und der Zahnaussprossung bei der Maus, zur Lungenreifung in foetalen Kaninchen (Catterton et al., 1979). Ferner stimuliert es das Magenmukosa-Wachstums bei Ratten (Dembinski et al., 1985) und inhibiert die Magensäure-Sekretion (Kirkegaard et al., 1983).

Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) kommt ubiquitär im gesamten Körper vor, wobei die höchste Konzentration in der Submandibulardrüse der männlichen Maus gefunden wird (die Konzentration in der Submandibulardrüse der weiblichen Maus ist ungefähr 10fach niedriger). Ebenfalls hohe Konzentrationen des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) weist die Niere auf, diese betragen allerdings nur 50% der Konzentrationen der Submandibulardrüse der männlichen Maus.

1.5.2 EGFR

Die Isolierung des EGF machte die Aufreinigung des EGF-Rezeptors aus der Plattenepithel-Karzinom-Zelllinie A431 - in welcher dieser überexprimiert wird (Wrann et al., 1979) – möglich, so daß cDNA-Sequenz (Downyard et al., 1984; Ullrich et al., 1984) und genomische Struktur (Haley et al., 1987) aufgeklärt werden konnten.

Der EGF Rezeptor ist ein 170 kDa großes Glykoprotein, welches aus den beschriebenen 3 Domänen besteht. Seine 621 AS große ECD ist für die Ligandenerkennung verantwortlich. Eine aus 23 AS bestehende TMD verankert das Protein in der Zellmembran und stellt das Bindestück mit der aus 542 AS bestehenden ICD dar, welche vornehmlich Tyrosin-Kinase-Aktivität aufweist.

Das EGF-Rezeptor-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 7p14-12, bei der Maus auf Chromosom 11 und bei der Ratte auf Chromosom 14. Es ist ungefähr 110 kb groß und besteht aus 26 Exons, von denen die Exons 2 - 14 für die extrazelluläre Domäne, die Exons 5 - 8 und 12 - 14 für die cysteinreiche Domäne, Exon 15 für die transmembrane Domäne, die Exons 16 - 21 für die Tyrosin-Kinase-Domäne und die Exons 22 - 26 für die Autophosphorylierungs-Region kodieren.

Der EGF-Rezeptor wird - mit Ausnahme des hämatopoetischen Systems - in allen Geweben exprimiert. Experimentell konnte gezeigt werden, daß die meßbare Menge von mRNA für den EGF-Rezeptor nach Stimulierung mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) stark ansteigt (Clark et al., 1985; Earp et al., 1986; Kudlow et al., 1985).

1.6 EGF-Rezeptor-Variante

In den vergangenen Jahren wurden mehrere trunkierte/alterierte – das heißt in ihrer Größe und ihrem Aufbau veränderte - Formen des EGF-Rezeptors entdeckt und beschrieben (s.a. Abb. 7). Alterierte Rezeptoren sind weitverbreitet in der Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Growth Factor Receptors/GFR) (s.u.) und können physiologisch z.B. durch Proteolyse des transmembranen Rezeptors, alternatives Splicing der mRNA oder Gen-Rearrangement innerhalb eines Chromosoms (Merlino et al.; 1985) entstehen; ebenso aber auch auf dem Boden von Mutationen. Bei letzterem Mechanismus handelt es sich dementsprechend um einen unphysiologischen Vorgang. Man hat bislang in Tumoren ausschließlich diese mutagen generierten Rezeptoren nachweisen können.

Die am häufigsten vorkommende mutagene – also unphysiologische – Variante (s. Abb. 8) des EGF-Rezeptors ist durch eine Deletion der Exons 2 – 7 gekennzeichnet (EGFRdelta2-7), resultierend in einem Verlust von 267 Aminosäuren (Nagane et al., 1996; Prigent et al., 1996; Yamazaki et al., 1988; Nishikawa et al., 1994). Folge ist ein in der extrazellulären Domäne trunkierter Rezeptor. Die biologische Konsequenz dieses nur noch 140 kDa großen Rezeptors ist nicht letztendlich geklärt. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß diese Alteration zu einer verstärkten Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Aktivität (Yamazaki et al., 1988) bzw. zu einer konstitutiven Phosphorylierung des Rezeptors (Prigent et al., 1996) in Abwesenheit von stimulierenden Wachstumsfaktoren führt. Ein sehr ähnlicher Mechanismus ist für das Protoonkogen *v-erbB* bekannt. *v-erbB* kodiert ebenfalls für eine trunkierte Form des EGF-Rezeptors, dessen Kinase-Domäne gleichfalls konstitutiv aktiviert ist; bedingt durch eine Deletion in der extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne (Hayman und Enrietto, 1991).

Durch die Deletion kommt es zu einem Verlust der negativen Regulation der extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne auf die zytoplasmatische RTK. Der Effekt ist eine konstante wachstumsfaktorunabhängige Stimulation der Proliferation (Ullrich und Schlessinger, 1990).

Nagane et al. (1996) konnten zeigen, daß – wahrscheinlich bedingt – durch diese Aktivitätssteigerung einerseits ein erhöhter Proliferations-Index resultiert, es andererseits zu einem erniedrigten Apoptose-Index kommt. Desweiteren konnte durch

Untersuchungen an der humanen Gliom-Zelllinie U87MG Δ EGFR eine verstärkte Resistenz gegen Nährstoff-/Serumentzug gezeigt werden. Bei U87MG Δ EGFR-Zellen handelt es sich um eine Linie, die den in der extrazellulären Domäne trun-kierten Rezeptor (EGFR Δ 2-7) exprimiert (s.a. Nishikawa et al.; 1994).

Nishikawa (1994) wies experimentell nach, daß subcutane oder intracerebrale Implantation von U87MG Δ EGFR-Zellen bei Mäusen *in-vivo* 1) zu einer beschleunigten Wachstumsrate, 2) zu einer vermehrten Tumormasse und 3) einer erhöhten Letalität führt.

Weber et al. (1984) berichten über eine mutagen entstandene Variante des EGF-Rezeptors in A431-Karzinom-Zellen (s. Abb.8). Dieses – im Gegensatz zum normalen 170 kDa großen full-length-EGF-Rezeptor – nur etwa 105 kDa große Protein (mRNA-Größe von 2.8 kb), welches im Medium von A-431-Zellen nachgewiesen wurde, zeigt ein kompetitives Verhalten mit dem EGF-Rezeptor für mono/polyklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor. Allerdings war seine Affinität zu EGF 20-40mal geringer als die des full-length-Rezeptors.

Generell ist festzuhalten, daß es eine Vielzahl von alterierten, löslichen EGF-Rezeptor-Varianten gibt. Ihre oftmals unterschiedlichen biologischen Effekte und Funktionen sind noch nicht vollständig bekannt. Es soll daher nur kurz auf die bis dato möglichen Funktionen der alterierten Rezeptoren eingegangen werden.

Untersuchungen von Chen et al. (1987) zu Folge, sollen alterierte Rezeptoren am Vorgang der Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes mitbeteiligt sein. Experimente mit NIH3T3-Fibroblasten, die einen Kinase-aktiven, Internalisierungsdefekten Rezeptor aufwiesen, führten 1) zu einer EGF-abhängigen Phenotyp-Transformierung, 2) einem Verlust der Kontakt-Inhibition und 3) einer verminderten Abhängigkeit von Nährstoffdeprivierung.

Ebenso konnte von Wells et al. (1990) in Dosis-Antwort-Studien nachgewiesen werden, daß diese sog. Internalisierungs-Mutanten in Gegenwart geringer EGF-Konzentrationen eine Transformation des Phenotyps aufweisen.

Flickinger et al. (1992) wiesen ein 70 kDa großes lösliches Protein in CEF (chicken embryo fibroblast)-Zellen nach (s. Abb. 8). Durch diesen alterierten extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors konnte *in-vitro* die TGF- α -abhängige Koloniebildung bei CEF-Zellen in Soft-Agar blockiert werden. Die Möglichkeit des intrazellulären Antagonismus kann jedoch auch eine der Inhibition entgegengesetzte Wir-

kung haben. So konnte von Scott et al. (1993) gezeigt werden, daß die exzessive Produktion und intrazelluläre Retention eines 100 kDa großen löslichen Rezeptors (ECD) eine Resistenz gegen die Wachstum-inhibierenden Effekte des ErbB2/HER2-Antikörpers muMAb4D5 zur Folge hat. Es wird postuliert, daß es nach dem Vorgang der Internalisierung des Rezeptor-Antikörper-Komplexes zu einer intrazellulären Dimerisierung mit der ECD des löslichen Rezeptors kommt, was in einem Ausbleiben der Wachstum-inhibierenden Antwort der Zelle resultiert. Flickinger et al. (1992) wie auch Maihle et al. (1991) nehmen desweiteren noch eine (physiologische) Funktion für den alterierten EGF-Rezeptor an. Diese könnte a) in einer Reservoirfunktion für Wachstumsfaktoren im Serum, b) einer Verlängerung der Halbwertszeit/HWZ und/oder c) einer veränderten Verteilung im Organismus bestehen.

O'Rourke et al. (1997) berichten über einen dominant-negativ supprimierenden Effekt der ECD des neu-Onkogen in humanen GBM. O'Rourke konnte durch den Transfer der neu-ECD in EGF-Rezeptor-produzierende GBM-Zellen eine Inhibierung des Transformations- und Proliferationsverhaltens zeigen.

Petch et al. (1990) entdeckten in Normalgewebe von Leber, Lunge, Plazenta, Dezidua und Uterus der Ratte ein 95 kDa großes Rezeptor-Protein (s. Abb. 8), bestehend aus der ECD, dessen genaue biologischen Funktionen nicht bekannt sind. Angenommen wird jedoch - und dies steht in Gegensatz zu den bislang beschriebenen Effekten - eine physiologische Funktion.

Reiter et al. (1996) beschreiben ein 60 kDa-Rezeptor-Protein (s. Abb. 7), dessen biologische Funktion in seiner wachstumsregulierenden Rolle mittels Heterodimerisierung mit EGF-Rezeptor und/oder Inaktivierung der Tyrosin-Kinase-Aktivität (s.a. Basu et al.; 1989) angenommen wird.

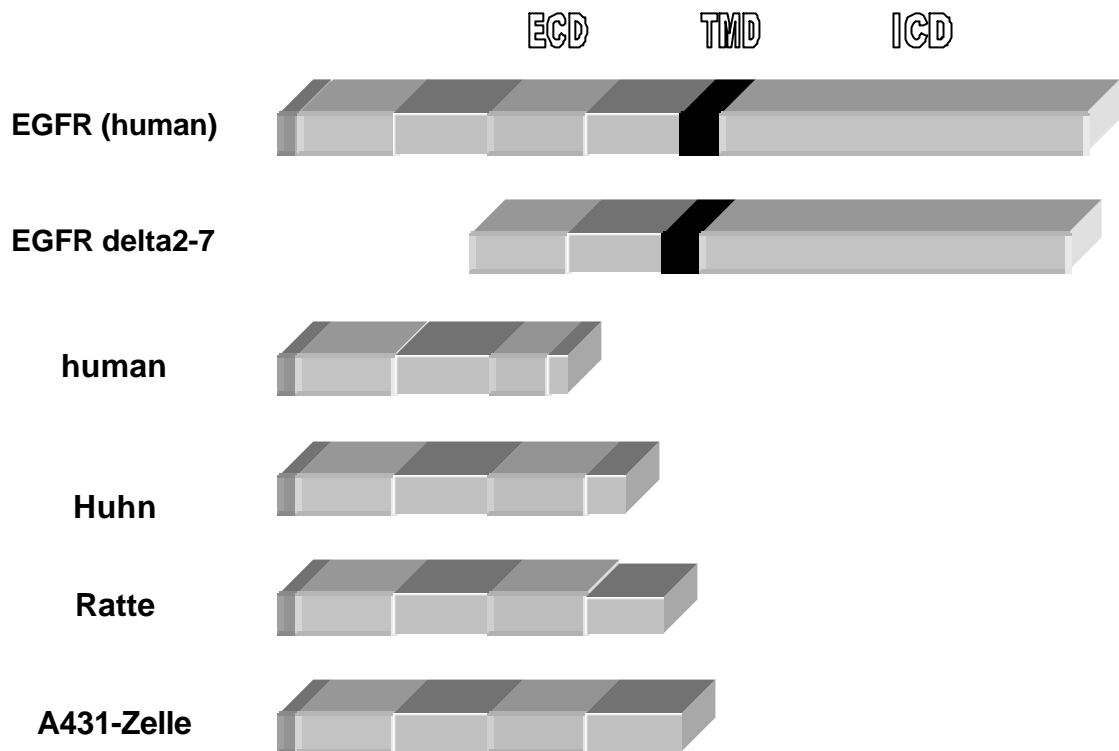


Abb. 7 Schematische Darstellung verschiedener löslicher EGF-Rezeptorvarianten

1.7 Überexpression in humanen Gliomen

Klinische und molekulargenetische Studien konnten mittlerweile zeigen, daß es verschiedene molekulargenetische Wege gibt, die zur Entwicklung eines GBM - das zu den häufigsten malignen Tumoren des Gehirns des Erwachsenen zählt und etwa 20% aller neuroepithelialen Neoplasien ausmacht (Zülch, 1986) – führen können. Die stadienhafte Progression bei sekundären GBM korreliert hierbei gut mit verschiedenen genetischen/chromosomalen Veränderungen und unterscheidet sich deutlich von der Genetik primärer, sog. „de-novo“-GBM (Reifenberger et al., 1996).

Die folgende Abbildung (Abb. 8) soll den Entstehungsprozeß bei GBM verdeutlichen.

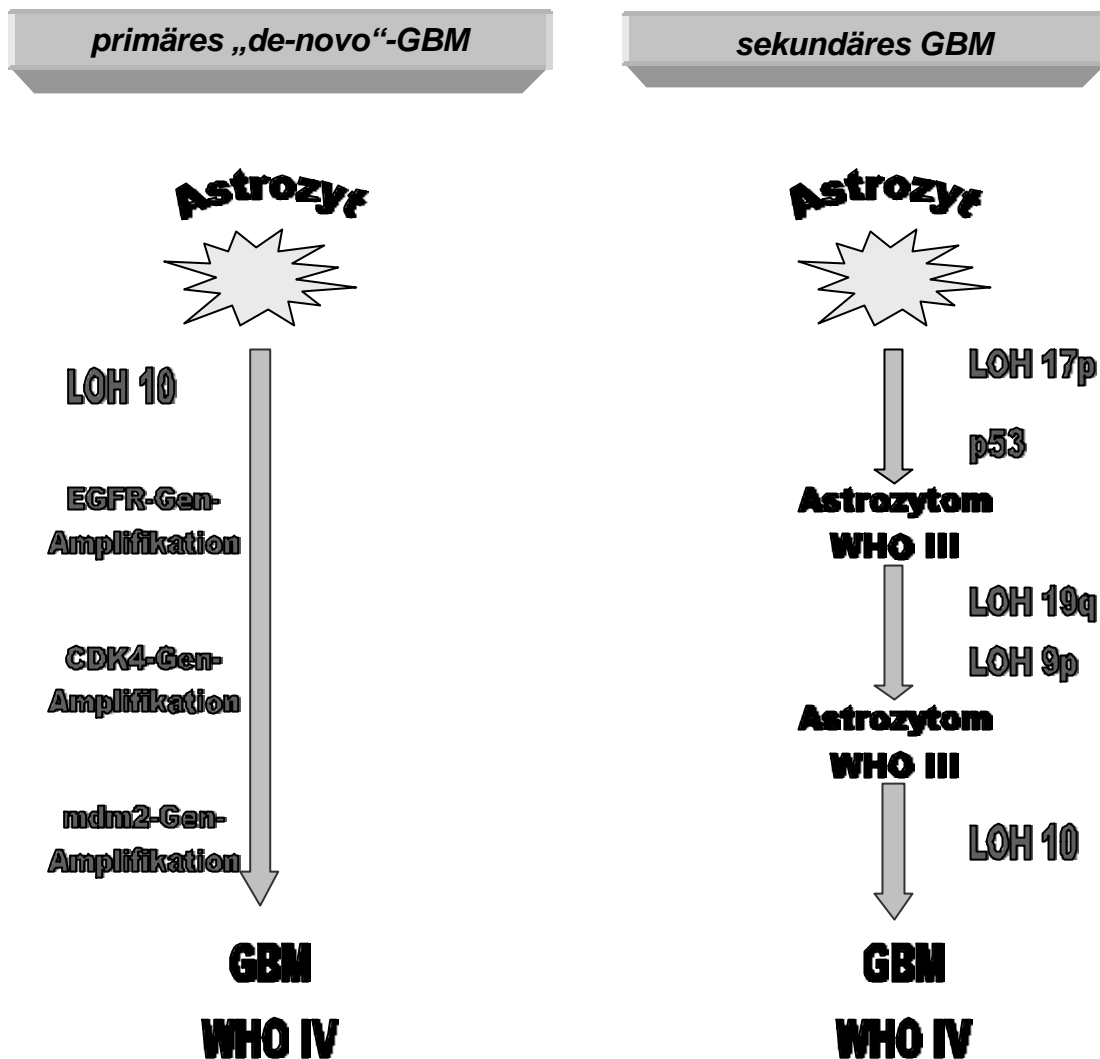


Abb. 8 Vereinfachte Darstellung der unterschiedlichen Pathogenese und der zugrunde liegenden molekulargenetischen Veränderungen bei primären und sekundären humanen GBM

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß ein GBM sowohl „de novo“ (primäres GBM) als auch progredient über ein „low grade“ und/oder AA, also sekundär, entstehen kann. Interessant ist hierbei die Beobachtung, daß eine Mutation von p53 in primären GBM eher selten (11%) auftritt, in sekundären GBM hingegen sehr häufig (67%). Im Gegensatz hierzu zeigt sich in primären GBM eine hohe Inzidenz von EGFR-Gen-Amplifikationen (63-85% bzw. 40-50%) (Rasheed et al., 1996; Collins, 1993), die in sekundären GBM jedoch nur vereinzelt (10%) nachzuweisen ist (Watanabe et al., 1996; Tohma et al., 1998; Lang et al., 1994).

Diese Ergebnisse werden von Reifenberger et al. (1996) wie auch Schlegel et al. (1994) bestätigt, die eine EGF-Rezeptor-Amplifikation in GBM bei ungefähr 40 % bzw. 45 % nachweisen konnten, hingegen nicht in Astrozytomen Grad I u. II. Eine p53-Mutation konnte hingegen in Astrozytomen Grad I, II und III gefunden werden, nicht jedoch in GBM.

Dies gewinnt noch durch den Umstand an Wichtigkeit, daß primäre und sekundäre GBM histologisch nicht klar voneinander unterschieden werden können (Burger und Green, 1987). Klinisch werden sekundäre GBM eher bei jüngeren Patienten (Durchschnittsalter: 40.5 Jahre) beobachtet (v. Deimling, 1995) und gehen mit einer insgesamt „besseren“ Prognose einher (Winger et al., 1989). Primäre GBM werden hingegen bei höherem Durchschnittsalter (56.3 Jahre) gefunden und sind prognostisch äußerst ungünstig einzustufen.

Venter und Thomas (1991) konnten in Biopsiematerial maligner humaner Gliome ebenfalls eine Überexpression verschiedener Faktoren - z.B. PDGF, TGF- α , FGF sowie VEGF – nachweisen, die Genamplifikation und Überexpression des EGF-Rezeptors war jedoch die häufigste Veränderung. Alitalo und Schwab (1986) fanden gleichfalls eine Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens in 40-50% der GBM.

Wie schon zu Beginn des Abschnitts erwähnt, scheint der EGF-Rezeptor eine wichtige Mitbedingung bei der Entstehung glialer Tumoren zu sein.

Weiterhin kontrovers wird hingegen noch die Frage diskutiert, ob eine Beziehung zwischen der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation und der Überlebenszeit von Patienten mit GBM besteht. Hurrt et al. (1992) sowie Leenstra et al. (1998) berichten über eine längere Überlebenszeit bei Patienten mit GBM ohne EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation. Bigner et al. (1988) und Rainov (1997) hingegen konnten keine Korrelation zwischen Ausmaß der Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens und der Überlebenszeit ausmachen.

Schlegel et al. (1994) untersuchten nicht nur die Überlebenszeit, sondern den Zeitraum, der bis zum Auftreten eines Rezidives verging - das sog. postoperative rezidivfreie Intervall (RFI). Die Patientengruppe, in deren GBM's keine EGF-Rezeptor-Genamplifikationen nachgewiesen werden konnten fielen durch längere RFI auf, zeigten jedoch gleichzeitig keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der postoperativen Überlebenszeiten gegenüber der Patientengruppe, in deren GBM eine EGF-Rezeptor-Genamplifikationen nachgewiesen werden konnte.

1.8 Perspektiven

Das fortschreitende, wenn auch momentan noch bei weitem nicht vollständige Verständnis der Biologie maligner Tumoren des ZNS, könnte in der Zukunft die Möglichkeit verschiedener Therapien eröffnen. Wenn diese Möglichkeiten auch im einzelnen noch der experimentellen und klinischen Überprüfung bedürfen, wären grundsätzlich jedoch folgende Möglichkeiten denkbar:

1. *Verwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren*

1.1 Einsatz monoklonaler Antikörper (Faillot et al., 1996; Baselga und Mendelsohn, 1994) zur Hemmung der Signalübertragung und des Tumorwachstums durch Induktion der Endozytose sowie mittels Inhibierung der Dimerisierung RTK (Klapper, 1997).

1.2 Unterbrechung der Signaltransduktionskette mittels spezifischer Peptid-Liganden, die mit den SH2- und SH3-Domänen zytoplasmatischer Bindungsproteine interagieren (Smithgall, 1995).

1.3 Einsatz sog. Tyrphostine. Hierbei handelt es sich um Moleküle, welche die Tyrosinkinase-Aktivität hemmen. Sie sind in Anlehnung an natürliche Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Erbstatin, Herbimycin A, Genistein o.a. entwickelt worden, besitzen jedoch die Eigenschaft nur bestimmte RTK oder Vertreter ihrer Untergruppen zu hemmen (Singh et al., 1997).

2. *Gentransfer*

2.1 „Prodrug“ Therapie. Bei diesem Ansatz werden Gene, die für „pro drug“ aktivierende Enzyme kodieren, in Tumorzellen transfiziert.

Der Transfer des Herpes-simplex-Virus (HSV) Thymidinkinase-Gens mittels Injektion rekombinanter Retroviren *in-vivo* konnte bereits umgesetzt werden. Hier kommt es durch die Thymidinkinase zur Umwandlung von Ganciclovir („pro-drug“) in ein zytotoxisches Nucleosidanalogen (Connors, 1995; Culver et al., 1994).

2.2 Induktion einer Anti-Tumor-Immunantwort durch

- Transfektion bestimmter Gene, mit dem Ziel der Immunisierung der Tumorzelle. Es handelt sich hierbei um Gene, die z.B. für T-Zell-aktivierende oder phagozytose-stimulierende Moleküle (Interleukin-2, CD40 u.a.) kodieren (Bubenik et al., 1988; Chen et al., 1992).
- Verwendung bispezifischer Antikörper, die sowohl an die Tumorzelle wie auch an bestimmte Effektorzellen – z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen oder T-Killerzellen – binden können (Shalaby et al., 1992).
- „genetisch designte“ Viren, die für ein spezielles Tumorsuppressorgen oder ein Apoptose-Gen kodieren und in die Tumorzellen eingeschleust werden (Martuza, 1991).

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an chemisch-induzierten Hirntumoren der Ratte folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- kann in den untersuchten Tumoren eine Amplifikation des Gens für den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors – wie bei humanen GBM beobachtet – nachgewiesen werden,
- kommt es zu einer Überexpression des EGF-Rezeptors auf der Zellmembran

und

- treten posttranskriptionelle Alterationen der EGF-Rezeptor-mRNA – im Sinne eines alternativen Splicing - auf und welche Rolle könnte ihnen zukommen?

Die Übertragbarkeit der beim Menschen gewonnenen Ergebnisse auf die Verhältnisse bei der Ratte ist notwendig zur Etablierung eines geeigneten Tiermodells, an dem zukünftig die Möglichkeiten einer therapeutischen Beeinflussung - sei es in Form einer Gen- oder Chemotherapie - erprobt werden könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterial

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern im Text der vorliegenden Arbeit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Darmstadt, Roth, Karlsruhe, und Boehringer Ingelheim Biotechnologie (vormals: Serva), Heidelberg, bezogen. Sterile Plastikwaren für die Zellkultur stammten von der Firma Sarstedt, Nümbrecht; die Zellkultur-Medien und -Seren von der Firma Gibco BRL, Karlsruhe. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Puffer (s. Kap. 3.1.5) wurden, sofern im Text nicht abweichend beschrieben, nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989) erstellt. Alle eingesetzten Puffer sind unter Kap. 3.1.5 zusammengefaßt. Die Oligonukleotide (s. Kap. 3.1.3), die für die Polymerase-Kettenreaktion als Primer eingesetzt wurden, wurden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

3.1.2 Geräte

Folgende Geräte wurden in der vorliegenden Arbeit benutzt:

Als Thermocycler wurde ein MaxiCycler PTC-100 von MJ Research (vertrieben durch Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) eingesetzt. Die Protein- Elektrophoresekammer wurde von BIO RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland, das Netzgerät von Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden und der Geltrockner ebenfalls von BIO RAD bezogen. Das Spectrophotometer stammte gleichfalls von Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.

3.1.3 PCR- Primer

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer, die für die PCR Verwendung fanden, wurden anhand des PC-Programmes DNASIS™ und entsprechend den Regeln für Primerkonzepte (Taylor, 1993) erstellt.

Die Sequenzen wurden mit Standardeinträgen in der Gendatenbank (GDB, <http://www2.ncbi.nlm.org>) des National Center of Bioinformatics (National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA) mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen (Altschul et al., 1990).

Für die Polymerasekettenreaktion wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt (s.a. Abb. 9):

Exon A:

1801 1904 1937

GTGGAAAAT....ACTATGTTGATGGTCCCCACTGTGTCAAGACCTG
sense

TGGTCCCCACTGTGTCAAGAC

CACCTTTTA....TGATACAACCTACCAGGGGTGACACAGTTCTGGAC
anti-sense

1980 2023

GTTTGCAGATGCCAATAACGTCTGCCACCTCTGCCATGCAAACCT

sense TCTACGGTTATTGCAGACGGT

CAAACGTCTACGGTTATTGCAGACGGTGGAGACGGTACGTTTGA

anti-sense

Primer-Information zu Exon A:

Optimale Annealing Temperatur: 55.8 °C (max: 72.0° C)

	Länge	Position	Tm (°C)	GC (%)	3`G (kcal/mol)
Produkt	93		84.9	55.9	
sense	21	1914	71.6	52.4	-6.4
anti-sense	21	1986	71.2	47.6	-6.6

sense-Primer: RNEGFRaf

anti-sense-Primer: RNEGFRAr

Exon B:

2024 2044 2074

GTACC....GGCCAGGCCTTAAGGATGTCAACAACCAGAAGG

anti-sense

CCAGGCCTTAAAGGATGTCA

CATGG....CCGGTCCGGAATTTCTACAGTTGTTGGTCTTCC

sense

Exon NH:

2075 2289 2316 2348

TTCCA...GATTGTCTACAAAATGCCTGCCTGATGC...CTTGTCC(A)₁₈

anti-sense **CAGATGTTTTACGGACGGACT**

AAGGT..CTAACAGATGTTTTACGGACGGACTACG...GAACAGG(T)₁₈

sense

Primer-Information zu Exon B und Exon NH:

Optimale Annealing Temperatur: 53.1°C (Max:71.5°C)

	Länge	Position	Tm (°C)	GC (%)	3`G (kcal/mol)
Produkt	170		82.3	43.5	
sense	20	2044	68.5	50.0	-6.7
anti-sense	21	2193	68.7	47.6	-5.5

sense-Primer: RNEGFRNHf (Exon B)

anti-sense-Primer: RNEGFRNHr (Exon NH)

3.1.4 Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde folgender Antikörper benutzt:

EGFR gp170 ImmunoCruzTM System, ein Multi-Komponenten System, das kommerziell von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California 95060, USA bezogen wurde. Dieses Multi-Komponenten-System ist geeignet, die EGF-Rezeptor Expression in humanen und tierischen Zellextrakten zu erkennen; es zeigt keine Kreuzreaktion mit Neu oder ErbB-3 und setzt sich zusammen aus:

- **EGFR (R-1):** monoklonales Mäuse IgG_{2b}; human EGF-Rezeptor spezifisch; nicht kreuzreaktiv mit Mäuse EGF-Rezeptor
- **EGFR (1005):** polyklonales Kaninchen IgG; Maus-, Ratten- und Humanreaktiv.
- **Puffer-System:**
- **Kontroll Blocking-Peptid**

3.1.5 Puffer und Lösungen

Es wurden folgende Standardpuffer (nach Sambrook et al., 1989) verwendet:

- TE Puffer (Tris-EDTA) 10 mM TRIS, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0
- TAE Puffer (pH 8.5) 40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8.5
- TBS Puffer 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl
- TTBS Puffer 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,05% Triton X-100
- SDS-Ladepuffer 10% SDS, 50% Glycerol, 0.4 M Tris-HCl pH 6.8, 10% Mercapto-Ethanol, 0,1% Bromphenolblau
- PBS-Puffer 137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄; pH 7.4
- DNA-Ladepuffer(10x) 0.1% Bromphenolblau (in H₂O), 0.1% Xylen-Cyanol (in H₂O), 15% Ficoll 400,
- HOM-buffer 0.3M Saccharose, 10mM NaCl, 1.5mM MgAcetat, 10Mm TrisHCl, pH 7.5 - 8.0, 1mM DTT, 0.1% Triton-X-100
- PCA Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) als fertiges Roti-Phenol (Fa. Roth)

3.1.6 Tumormaterial

3.1.6.1 Tumorgewebe

Das verwendete Tumorgewebe stammte aus glialen Tumoren, die durch die einmalige intraperitoneale oder intravenöse Gabe von 50 mg/kg Ethylnitrosourea (ENU) am 19. Tag der Gestation einer graviden Ratte bei deren Nachkommen induziert wurden.

3.1.6.2 Transplantations-Tumorlinien

Bei den hier verwendeten Transplantations-Tumorlinien handelt es sich sowohl um gliale Tumorzelllinien (G-XVII und G-XVIII) als auch um Neurinom-Zelllinien (N-XIV, N-XV und N-XVI), die als Kontrolle dienten.

G-XVII

- leitet sich von einem durch ENU induzierten differenzierten Oligo-Astrozytom (T172, s. Tab. 3) bei einem weiblichen Tier ab.
- intrazerebrale Tier-zu-Tier-Transplantation über 8 Passagen

G-XVIII

- leitet sich von einem durch ENU induzierten anaplastischen Oligo-Astrozytom (T140, s. Tab. 3) bei einem männlichen Tier ab.
- intrazerebrale Tier-zu-Tier-Transplantation über 10 Passagen.

N-XIV

- leitet sich von einem durch ENU induzierten malignen Neurinom einer Nervenwurzel (T384, s. Tab. 3) ab.
- subcutane Tier-zu-Tier-Transplantation.

N-XV

- leitet sich von einem durch ENU induzierten malignen, peritonealen Neurinom (T387, s. Tab. 3) ab.
- subcutane Tier-zu-Tier-Transplantation.

N-XVI

- leitet sich von einem durch ENU induzierten malignen Wurzelneurinom (T383, s. Tab. 3) ab.
- subcutane Tier-zu-Tier-Transplantation.

Nr.	Zelllinie	Passage	Tumor-Nr.
1	G-XVII	Primärtumor	172
2	G-XVII	2	153
3	G-XVII	2	154
4	G-XVII	4	123a
5	G-XVII	5	113
6	G-XVII	5	114
7	G-XVII	6	150
8	G-XVII	7	144
9	G-XVII	7	145
10	G-XVIII	Primärtumor	140
11	G-XVIII	1	9200
12	G-XVIII	2	9196
13	G-XVIII	2	9197
14	G-XVIII	5	221
15	G-XVIII	5	226
16	G-XVIII	6	217
17	G-XVIII	6	218
18	G-XVIII	6	231
19	G-XVIII	6	230
20	G-XVIII	9	239
21	G-XVIII	9	247
22	G-XVIII	10	272

23	N-XIV	2	605
24	N-XV	Primärtumor	387
25	N-XV	2	767
26	N-XV	3	604
27	N-XV	6	771
28	N-XV	8	608
29	N-XV	10	615
30	N-XV	11	623
31	N-XVI	3	607
32	N-XVI	Primärtumor	639

Tab.3 Zugehörigkeit der Tumoren zur jeweiligen Zelllinie und Passage

3.1.6.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden eingesetzt:

C6

Gliom-Zelllinie

- leitet sich von einem transplacentar durch Methylnitrosourea (MNU) induzierten glialen Tumor ab (Benda et al., 1968).
- keine genaueren Angaben über den verwendeten Stamm.
- häufiger Einsatz bei *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimenten.

RGL.3

Gliom-Zelllinie

- leitet sich von einem transplacentar durch Ethylnitrosourea (ENU) induzierten spinalen Misch tumor ab (Mennel, 1988).
- als Inzuchtstamm wurden BD-IX-Ratten verwendet.
- Etablierung als G-XIII-Transplantationslinie und *in vitro* als RGL.3-Linie.

9L

Gliosarkom-Zelllinie

- Induktion durch MNU-Injektionen (Kimler, 1994) und serielle Transplantation.
- als Inzuchtstamm wurden CD Fischer 344 Ratten verwendet.
- Einsatz vornehmlich bei *in-vitro*-Experimenten (Peterson, 1994).

RG2

Gliom-Zelllinie

- leitet sich von einem transplazentar durch ENU induzierten Gliom ab (Aas et al., 1995).
- als Inzuchtstamm wurden CD Fischer 344 Ratten verwendet.

F98

Gliom-Zelllinie

- leitet sich von einem durch ENU induzierten Gliom ab (Ko et al.; 1980a & 1980b).
- als Inzuchtstamm wurden CD Fischer 344 Ratten verwendet.
- klonale Zelllinie.

Die Zelllinien wurden uns freundlicherweise überlassen von:

Herrn Prof. Mennel	<i>Marburg</i>	C6, RGL.3
Herrn Prof. Wechsler	<i>Düsseldorf</i>	RG2, F98
Herrn Prof. Plate	<i>Freiburg i. Br.</i>	9L

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Isolierung

Das zur Isolierung von DNA verwendete Gewebe (-80°C gelagert) wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert und in eiskaltem HOM-buffer gewaschen, anschließend zentrifugiert (3000 rpm, 10 min) und in 3 ml HOM-buffer resuspendiert; dann Zugabe von Protease K (100µl/ml Ansatz) und SDS 0.5% (Gross-Bellard et al., 1973) und Inkubation bei 37°C über nacht oder wahlweise 2h im Wasserbad (63 °C). Anschließend Aussalzen mit NaCl und Ausfällen der DNA mit eiskaltem Ethanol 100%. Waschen der DNA mit kaltem Ethanol 70%, lösen in TE und Inkubation nach Zusatz von RNase (20µg/ml Ansatz) 1h lang bei 37°C. Hiernach wurde die Phenolextraktion durchgeführt, die DNA erneut mit eiskaltem Ethanol 100% ausgefällt, gewaschen (s.o) und getrocknet bevor sie in TE in Lösung gebracht wurde.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.2.1 Auswahl der Oligonucleotid-Primer

Bei der Auswahl der Oligonucleotid-Primer wurde darauf geachtet, daß mit dem Primerpaar RNEGFRNHr/f der Nachweis sog. Spleißvarianten (Petch et al. 1990) auf mRNA-Ebene möglich ist. Durch den Vorgang des alternativen Splicing wird die Zelle befähigt, mehrere Genprodukte aus einer einzigen Transkriptionseinheit zu generieren. Hierzu werden alternative Spleißstellen benutzt, durch welche verschiedene mRNA-Sequenzen entstehen, die für die jeweiligen Proteinisoformen kodieren. In der vorliegenden Arbeit war das Primerpaar RNEGFRNA innerhalb des Exon A lokalisiert. Der sense-Primer des Primerpaares RNEGFRNH ist in dem Exon B - das 5` des alternativ gespleißten Exon liegt - lokalisiert, der entsprechende anti-sense-Primer im non-homologen Exon (s. Abb. 10). Durch den Einsatz dieses Primer-Paares kann somit die Transkription des interessierenden Genabschnittes auf ein alternatives Splicing untersucht werden. An dieser Stelle muß

darauf hingewiesen werden, daß es sich beim Vorgang des alternativen Splicing um einen physiologischen Prozeß handelt. Die hierdurch entstandenen Rezeptor-Proteine müssen von Proteinen abgegrenzt werden, die durch einen mutagen herbeigeführten Transkriptionsabbruch, also mutagen veränderter mRNA, generiert wurden.

3.2.2.2 Transkriptionsstellen am EGF-Rezeptor-Gen

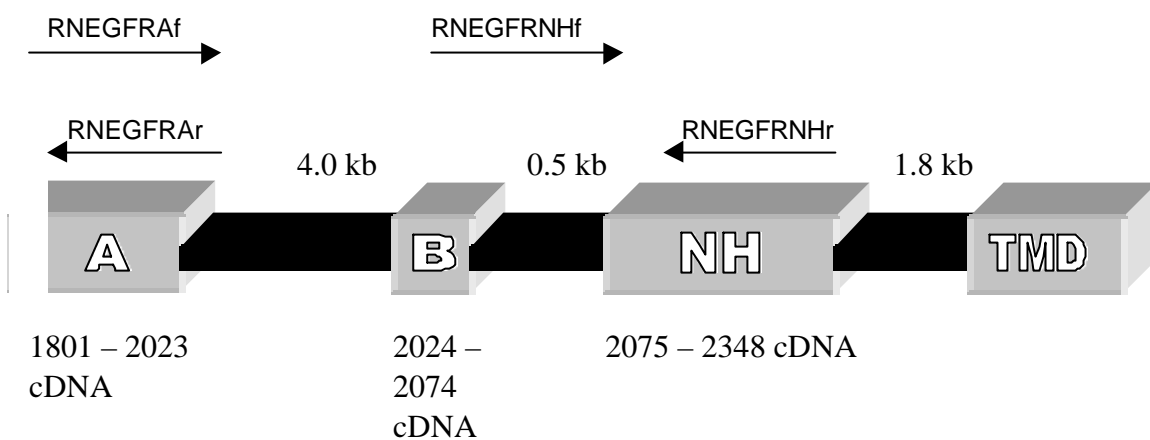


Abb. 9 Ausschnitt aus der EGF-Rezeptor-DNA mit den Transkriptionsstellen der jeweiligen Oligonucleotid-Primer.

3.2.2.3 PCR-Reaktionsbedingungen

Es wurden je 10 µl der genomischer DNA mit 40 µl PCR-Master-Mix versetzt und anschließend in einem PCR-Thermocycler (MWG Biotech, Ebersberg oder MJ Research, Biozym) dem Temperaturprofil unterzogen, das für die jeweiligen Primerpaare spezifisch etabliert wurde.

PCR-Mastermix:	10 x PCR-Puffer	5 µl
	dNTP Mix	4 µl
	Primer	2 µl
	MgCl ₂	3 µl
	taq-Polymerase, 1U	0,2 µl
	autoklaviertes Millipore-H ₂ O	25,8 µl

Nach initialer Denaturierung der genomischen DNA-Vorlage für 5 min bei 94°C wurden 29-35 Zyklen, bestehend aus 60 sec 92°C, 60 sec Primeranlagerung (xx°C, Primer-spezifisch) und 120 sec bei 72°C Kettenverlängerung, durchgeführt. Bei der letzten Kettenverlängerung wurde 5 min bei 72°C inkubiert, um vollständige doppelsträngige PCR-Fragmente zu erhalten. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (5 % Polyacrylamid (19:1 Acrylamid/Bis-Acrylamid), 1x TBE, APS) aufgetragen und in einer MiniProtean II-Zelle (BioRad, München) bei 80 V konstanter Spannung je nach Fragmentgröße zwischen 1 - 2 Stunden aufgetrennt. Die visuelle Darstellung der PCR-Produkte erfolgte mit einer modifizierten Silberfärbung (Schlegel et al., 1996). Dazu wurden die Gele in 10% Ethanol fixiert (5 min), in 1% Salpetersäure oxidiert (3 min), in 0.012 M Silbernitrat inkubiert (20 min) und in einer Lösung aus 0.28 M Natriumcarbonat und 0.019 % Formalin reduziert bis Banden sichtbar wurden. Die Reduktion wurde mit 10% Eisessig beendet (2 min) und die Gele in destilliertes Wasser überführt (2 min). Anschließend wurden die Gele in einem Ventilationstrockner (BioRad, München, Deutschland) auf Whatman-Papier getrocknet.

Die Auswertung der Resultate erfolgte nach Einscannen der getrockneten Gele mit Hilfe eines konventionellen Scanners (HP5p, Hewlett Packard, Rüsselsheim) durch die Densitometrie-Software NIH Image Version 1.59. Hierzu wurde nach Abgleichung des Gelhintergrundes die optische Dichte der Referenzbande und des zu untersuchenden PCR-Produkts bestimmt. Anschließend wurde der Quotient aus beiden Werten ermittelt. Eine Veränderung des Quotienten gegenüber einer Normalgewebs-Kontrolle um mehr als 25 % wurde als signifikant bewertet.

3.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Diese Methode erlaubt den Nachweis antigener Komponenten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in Gewebeschnitten oder Zellausstrichen. Die Markierung kann hierbei durch Antikörper-gekoppelte, enzymatische Reaktionen, fluoreszierende Farbstoffe oder Goldpartikel geschehen.

3.2.3.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Mit einem Schlittenmikrotom wurden ~5 µm dicke Schnitte angefertigt, in 40°C warmes A. dest. überführt und auf beschichteten Objektträgern aufgefangen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Färbung wurde zur Kontrolle des Gewebeerhaltes der Präparate eingesetzt.

Mayers saures Hämatoxylin:	Hämatoxylin	1 g
	NaJO ₃	0,2 g
	Kalialaun	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	Citrat	1 g
Eosinlösung, wässrig:	Eosin-Y 1% in 100 ml A. dest., ein Tropfen Eisessig.	

Entparaffinierte und rehydratisierte Paraffinschnitte wurden 10 Sekunden in Mayer's saurem Hämatoxylin gefärbt und anschließend in fließendem Leitungswasser gebläut (3-5 min). Es folgte eine Eosin-Färbung für 15 Sekunden und die Differenzierung in 96% Ethanol (3-4 min). Die Entwässerung der Schnitte in 3 x 96% Ethanol, 3 x Isopropanol und Xylol I-III (je 5 min) schloß sich an. Das Eindecken erfolgte mit Corbit-Balsam (Depex).

3.2.3.3 Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) Reaktion nach Sternberger (1970)

Die Reaktion wurde an Paraffinschnitten durchgeführt; als Substrat wurde DAB verwendet. Die Inkubationen der Antiseren erfolgten in einer feuchten Kammer.

Die Konzentrationen der 1. Antikörper wurde für alle Markierungsversuche in Verdünnungsreihen ausgetestet und optimiert.

Die Paraffinschnitte wurden über Xylol I-III entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert (3 x Isopropanol, 2 x 96% Ethanol, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol je 5 min., A. dest. 5 min).

Zum Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte bei Bedarf in 3% H₂O₂ in A. dest. bei RT für 20 min im Dunkeln inkubiert.

Durchführung:

- Waschen in PBS/ Tween 20 (0,5%), 3 x 5 min.
- Absättigungspuffer (Milchpulver, 0,5% in PBS) 30 min.
- Inkubation mit 1. Antikörper, in Absättigungspuffer verdünnt, 4°C über Nacht.
- Waschen PBS/Tween 20, 3 x 5 min.
- Inkubation 2. Antikörper (1.Antikörper abhängig),
1:200 in Absättigungspuffer verdünnt, bei RT 1h
- Waschen PBS/Tween 20, 3 x 5 min.
- Inkubation mit PAP , 1:200 in Absättigungspuffer.
- Waschen PBS/ Tween 20, 3 x 5 min.
- DAB- Färbung für 10 min, ⇒
mikroskopische Kontrolle.
- Waschen in PBS und A. dest..
- Dehydratisierung in 2 x 96% Ethanol, 3 x Isopropanol, Xylol I-III je 5 min.
- Eindecken mit Corbit-Balsam.

DAB-Reagenz:	DAB	35 mg
	PBS	100 ml
	+ 50 µl H ₂ O ₂	

3.2.4 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurde der Rneasy[™] Total RNA Kit der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland, verwendet, welcher für Gewebe, Zellen und Bakterien benutzt werden kann. Mit diesem Rneasy[™] Total RNA Kit können alle RNA-Moleküle, die aus mehr als 200 Nucleotiden bestehen, isoliert werden.

Das zugrundeliegende Prinzip ist die Lyse unter denaturierenden Bedingungen, um die RNasen zu inaktivieren. Im Anschluß wird die RNA in einem Hochsalzpuffer an eine Silikatgelmembran gebunden und Kontaminierungen heruntergewaschen. Die isolierte RNA wurde in DEPC-behandeltem H₂O eluiert und bei –80 °C gelagert. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben.

3.2.4.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die mRNA der aus den Zellen und Geweben isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase nach dem Verfahren von Lee & Caskey (1990) in cDNA umgeschrieben. 3 µg der RNA in 7 µl DEPC wurden nach Zugabe von 1 µg Random-Hexamer-Primer (Promega, Heidelberg) für 10 min bei 70°C inkubiert. Die Probe blieb danach mindestens 2 min auf Eis stehen. Währenddessen wurden 10 µl RT-Mastermix 2 min bei 37°C inkubiert, 1 µl Reverse Transkriptase (200 U, M-MLV RNase H-minus, Promega, Heidelberg) dazupipettiert und zusammen mit dem RNA / DEPC-Mix für 120 min bei 37°C inkubiert.

RT-Supermix	DEPC	1.5 µl
	dNTP Mix	0.5 µl
	DTT	2 µl
	5xPuffer	5 µl
	RT	1 µl

3.2.5 Gel-Elektrophorese

3.2.5.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die verwendeten Agarose-Gel-Konzentrationen lagen zwischen 1.0 und 1.5%. Die Agarose wurde in 1xTAE Puffer durch Erhitzen gelöst.

In einem Ladepuffer wurde die DNA-Probe in die Taschen des Gels aufgetragen. Mit Laufzeiten von 1.5 - 2.5h und einer Spannung von 10V/cm wurde die Elektrophorese durchgeführt. 1xTAE diente als Laufpuffer. In 0.01%igem Ethidium-Bromid (EtBr) wurden die DNA-Fragmente 20 min im Agarose-Gel gefärbt und anschließend zum Entfernen des überschüssigen EtBr ebenfalls 20 min gewässert. Durch die Imprägnierung mit Ethidiumbromidlösung interkalieren die planaren Ethidiumbromidmoleküle proportional zur Größe/Menge der DNA, wodurch eine semiquantitative Aussage möglich wird. Die Fragmente wurden auf einem UV-Lichtschirm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Zum Größenvergleich diente ein Marker mit bekannter Größe (1kb ladder).

3.2.5.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen erfolgt in einer polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid (AA) und N,N'-Bisacrylamid (Bis). SDS zerstört alle nicht kovalenten Wechselwirkungen im Protein. Ein SDS-Anion lagert sich an ungefähr zwei Aminosäurereste der Hauptketten, wobei ein stark negativ geladener Komplex entsteht, der der Masse des Proteins in etwa proportional ist. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern kleine Moleküle schneller als große in Richtung zur Anode. Der zu trennende Molekulargewichtsbereich kann bei dieser Methode durch die AA/Bis-Konzentration bestimmt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Das Gen für den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktor

Die Untersuchungen zum EGFR-Gen der Ratte waren von besonderem Interesse, weil dieses Gen in primären humanen GBM häufig amplifiziert ist. Die genomische DNA der oben genannten Tumoren wurde mit den Oligonukleotid-Primerpaaren RNEGFRA bzw. RNEGFRNH (s. Kap. 3.1.3) untersucht. Beide Primerpaare wurden so gewählt, daß bei Untersuchungen der mRNA alternative Spleißvarianten (Petch et al., 1990) nachweisbar waren. Das Primerpaar RNEGFRA ist innerhalb des Exons A lokalisiert. Der sense-Primer RNHEGFRNH ist in dem Exon B, das 5' des alternativ gespleißten Exons angeordnet ist, und der antisense-Primer im non-homologen Exon, lokalisiert. Sie schließen ein ca. 500 bp großes Intron ein. Als Referenz-Locus wurde das β -Aktin-Gen der Ratte benutzt. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Fragmente wie beschrieben in nicht-denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, Silber-gefärbt, getrocknet und eingescannt. Die Integrierte Optische Dichte (IOD) wurde mit Hilfe der Densitometrie-Software NIH Image Version 1.59 ermittelt (s.a. Kap. 3.2.2.3) und berechnet (s. Tab. 4). Auf genomischer Ebene konnte mit beiden EGF-Rezeptor-Primerpaaren in keinem der untersuchten Tumoren oder Zelllinien eine Veränderung des Quotienten aus der IOD des jeweiligen EGF-Rezeptor-PCR-Fragments und einem der Referenz-Loci festgestellt werden (s Abb. 10 bis 14).

Abb. 10 – 14 Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen PCR für das EGFR-Gen

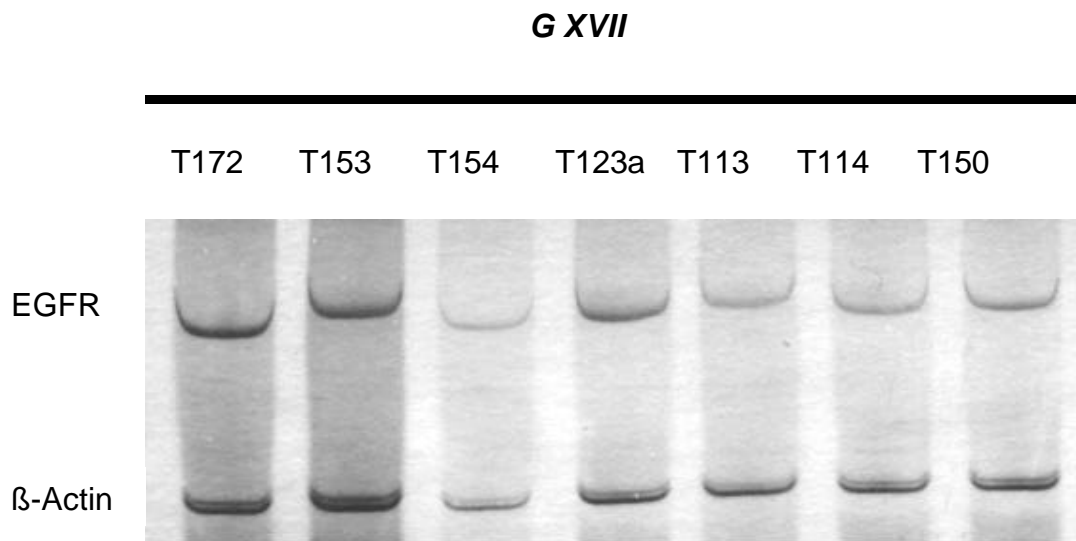


Abb. 10 Polyacrylamidgel der experimentellen Rattentumoren
(T = Transplantationstumor)

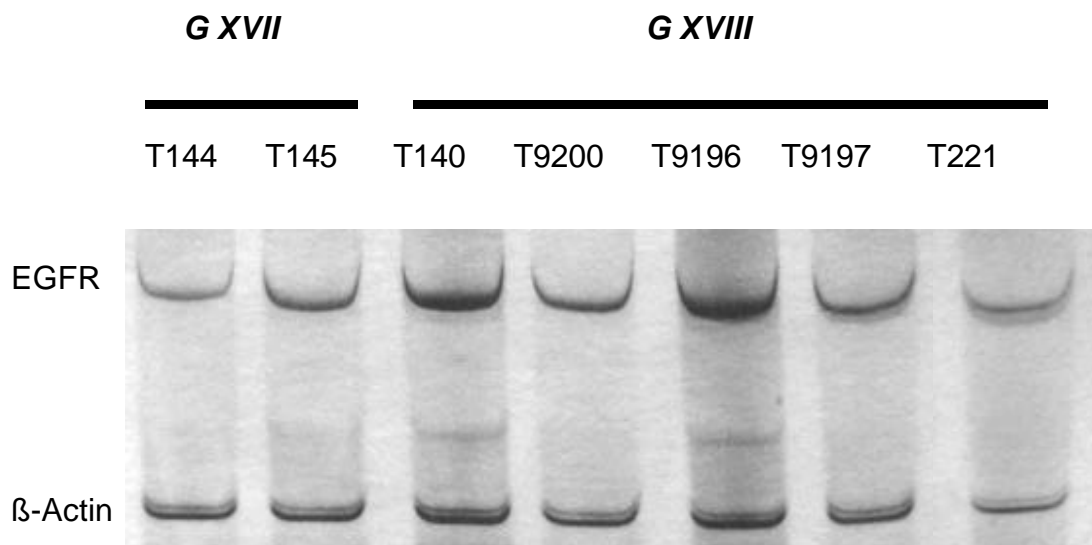


Abb. 11 Polyacrylamidgel der experimentellen Rattentumoren
(T = Transplantationstumor)

G XVIII

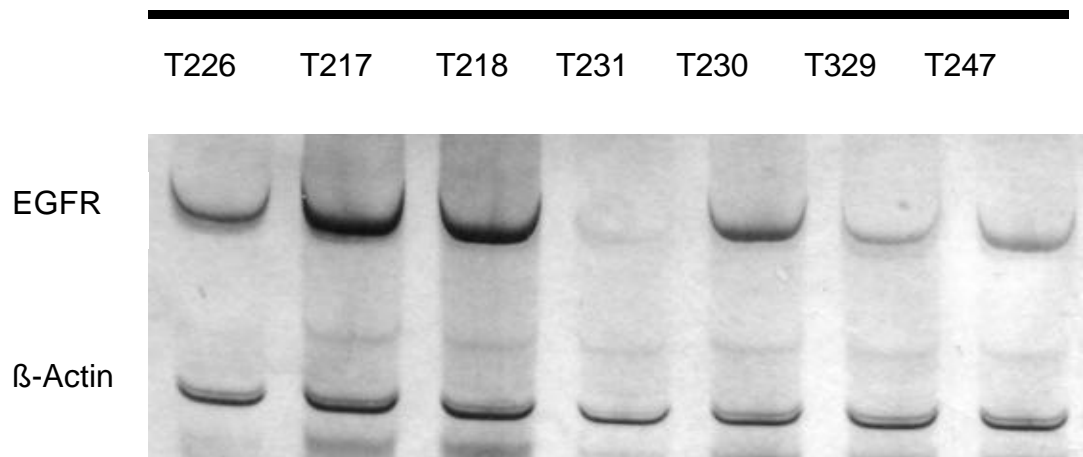


Abb. 12 Polyacrylamidgel der experimentellen Rattentumoren
(T = Transplantationstumor)

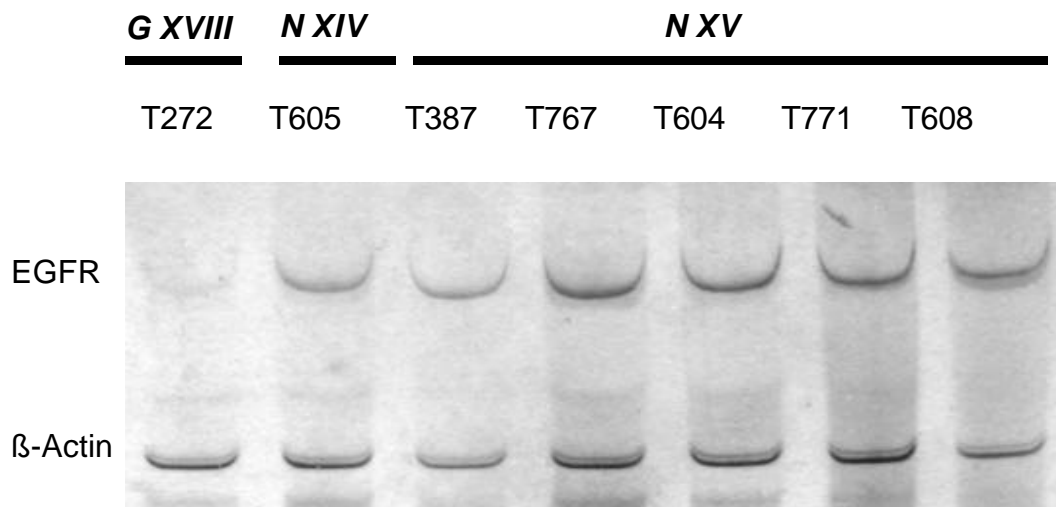


Abb. 13 Polyacrylamidgel der experimentellen Rattentumoren
(T = Transplantationstumor)

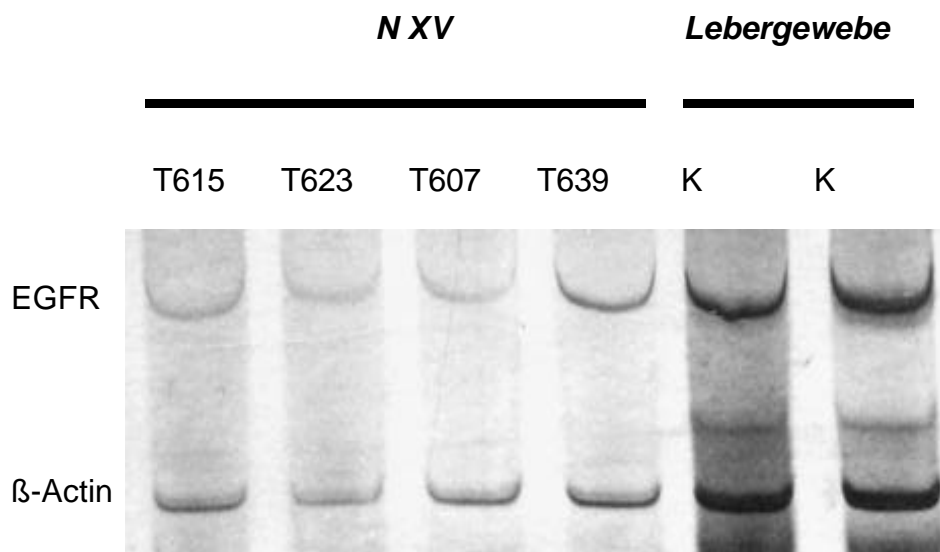


Abb. 14 Polyacrylamidgel der experimentellen Rattentumoren
(T = Transplantattumor; K = Kontrolle)

Zellinie	Tu-Nr.	Ratio IOD	Zellinie	Tu-Nr.	Ratio IOD
G-XVII	172	0.89		218	0.98
	153	n.i.		231	1.20
	154	0.97		230	0.82
	123a	1.02		239	0.98
	113	0.82		247	1.23
	114	1.14		272	1.25
	150	0.93	N-XIV	605	1.01
	144	1.08	N-XV	387	0.91
	145	1.06		767	0.94
G-XVIII	140	0.90		604	0.91
	9200	0.91		771	0.92
	9196	0.82		608	0.96
	9197	1.08		615	1.06
	221	0.90		623	0.96
	226	1.12	N-VI	607	0.95
	217	1.09		639	0.89
Kontrolle					0.98 – 1.20

Tab. 4 Rechnerisch ermitteltes Verhältnis der Integrierten Optischen Dichte (IOD) zum Referenz-Locus der untersuchten Tumoren (n.i. = nicht informativ)

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation

4.2.1 Expression der EGFR-mRNA

Um Veränderungen in der transkriptionellen Regulation zu untersuchen, wurde RNA aus den 5 glialen Zelllinien C6, F98, RG2, RGL.3 und 9L, mittels RT-PCR untersucht. Alle 5 Zelllinien zeigten ein 90bp großes PCR-Fragment, das mit dem Primerpaar RNEGFR A (s. Kap. 3.1.3) amplifiziert wurde, als Ausdruck der Expression des EGF-Rezeptor-Gens. Daneben fand sich ebenfalls bei den glialen Zelllinien C6 und 9L die Expression eines 170bp- großen PCR-Fragments, das mit dem Primerpaar RNEGFRNH (s. Kap. 3.1.3) amplifiziert wurde und ein alternativ gespleißtes Exon enthielt; das Amplifikat ist somit eine alternative Spleißvariante. Eine Herunter-Regulierung des full-length-Rezeptors – wie von Hakjoo und Maihle (1993) für full-length und alterierte *c-erbB3*-mRNA beobachtet – durch die alternative Rezeptor-Variante konnte an den glialen Zelllinien C6 und 9L jedoch nicht nachgewiesen werden.

Abb. 15 bis 17; Expression der EGF-Rezeptor-mRNA in den Gliomlinien 9L, F98, RG2, RGL3 und C6

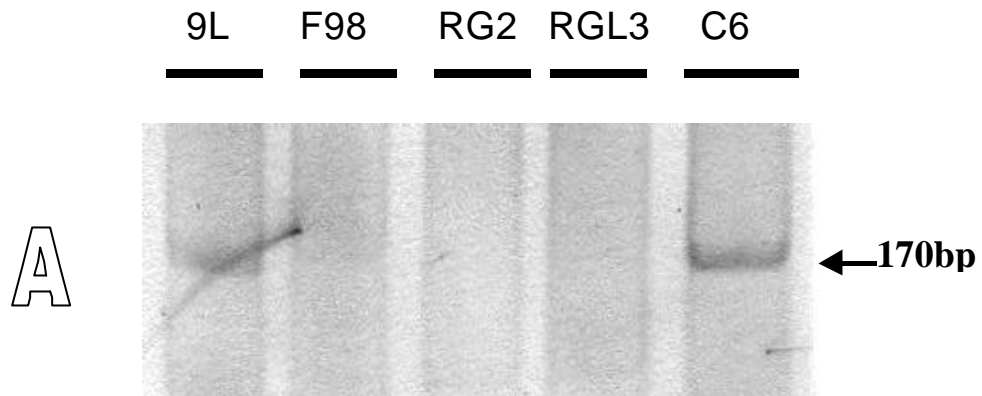


Abb. 15 Polyacrylamidgel der RT-PCR;
Primerpaar RNEGFRNH

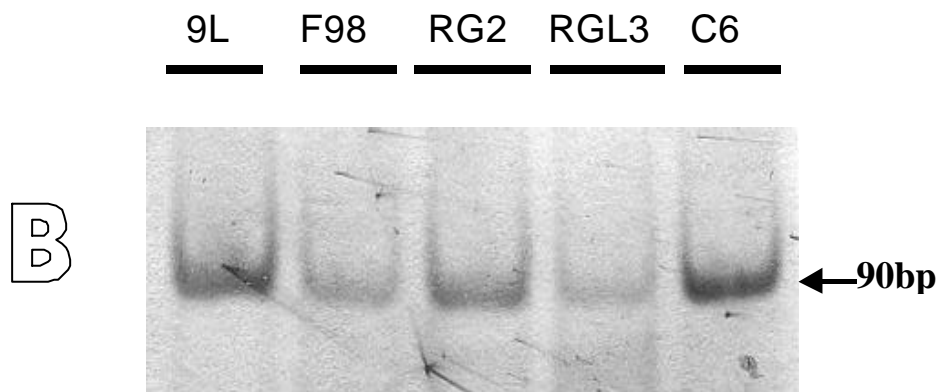


Abb. 16 Polyacrylamidgel der RT-PCR;
Primerpaar RNEGFRA

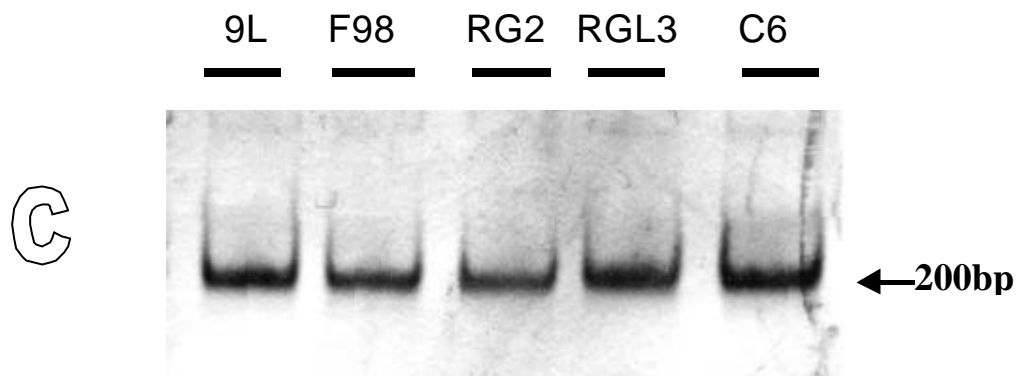


Abb. 17 Polyacrylamidgel der RT-PCR der β -Aktin-mRNA als Kontrolle

4.3 Immunhistochemische Untersuchungen

4.3.1 Untersuchungen zur Expression des Rezeptor-Proteins

Es wurde bereits eingangs erwähnt, daß sich die humanen Gliome einerseits durch eine häufige Amplifikation des Gens für den EGF-Rezeptor, andererseits durch eine ebenfalls vorliegende Überexpression desselben Rezeptors auszeichnen (Di Fiore et al., 1987). Mittels immunhistochemischer Methoden wurden Schnitte Parafin-fixierter Rattenhirne, die eine tumoröse Entartung aufwiesen, hinsichtlich einer Überexpression des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor untersucht. In keinem der untersuchten Tumoren konnte allerdings eine gesteigerte Expression beobachtet werden.

5 Diskussion

Faßt man den heutigen Wissensstand über das GBM zusammen, so gelangt man zu folgenden Ergebnissen/Erkenntnissen:

Das GBM stellt unter den primären Hirntumoren die weitaus bösartigste Erscheinungsform dar. Eine durchschnittliche postoperative Überlebenszeit von weniger als 12 Monaten und ein letztlich tödlicher Ausgang innerhalb von wenigen Jahren kennzeichnen das GBM. 75% der Patienten mit gesichertem GBM versterben sogar innerhalb von 18 Monaten (Shapiro, 1986).

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist es bislang nicht gelungen die - molekulargenetischen - Ursachen und Mechanismen, die der GBM-Entstehung zugrunde liegen, aufzudecken. Eine nicht unerhebliche Rolle scheint hierbei jedoch der EGF-Rezeptor zu spielen. Das Gen dieses Rezeptors, aus der Familie der Tyrosin-Kinasen, weist in untersuchten GBM in 40 -50 % der Fälle eine Amplifikation auf. Diese genetische Alteration zählt zu den konstantesten Veränderungen, weshalb eine Mitwirkung dieses Rezeptors bei der Tumorentstehung, wie auch bei der Tumorprogression vorstellbar ist. In humanen glialen Tumoren scheinen v.a. die EGF-Rezeptor-Signalwege von Veränderungen betroffen zu sein (Collins, 1994). Die Korrelation der EGF-Rezeptor-Genamplifikation mit einer klinisch und molekulargenetisch charakterisierten Subgruppe der GBM (v.Deimling et al., 1993; Watanabe et al., 1996) unterstreicht die tumorbiologische Bedeutung dieser Veränderungen in der Tumorprogression maligner Gliome. Dies, wie auch seine Lokalisation auf der Zelloberfläche, macht ihn zu einem interessanten Ziel immunologisch- und/oder gentherapeutischer Ansätze. Hierin liegt große Hoffnung für die Zukunft, wenn man sich vor Augen hält, daß aktuelle operative, strahlen- und chemotherapeutische Strategien, die sich nicht an molekulargenetischen Alterationen orientieren, keine wirklichen Fortschritte in der Prognose des GBM erbracht haben.

Um aber zukünftig neuentwickelte chemo/gentherapeutische Ansätze und deren Effizienz prüfen zu können, bedarf es geeigneter Modelle.

Grundvoraussetzung sollte eine größtmögliche Übereinstimmung - hinsichtlich molekulargenetischer Veränderungen - zwischen benutztem Tiermodell und humanen GBM sein (s.a. Kap. 5.1).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden - unter Einsatz der PCR- chemisch-induzierte Tumoren der Ratte, sowie etablierte gliale Zelllinien auf Veränderung des Gens für den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors untersucht. Hierbei ergaben sich für die primären Tumoren wie auch für die Transplantationstumoren und die etablierten Tumorzelllinien unterschiedliche Befunde:

eine Amplifikation des Gens für den Rezeptor des Epidermalen Wachstumsfaktors konnte - im Gegensatz zu Untersuchungen humaner GBM - in keinem der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden,

wohingegen

bei der Untersuchung zur posttranskriptionellen Regulation in zwei der fünf untersuchten glialen Zelllinien eine alternativ gespleißte Variante der EGF-Rezeptor-mRNA gezeigt werden konnte. Hier wird es sich am ehesten um ein physiologisches Rezeptor-Produkt denn um eine Tumor-spezifische Alteration handeln.

Hinsichtlich einer Überexpression des Rezeptors konnten die Befunde der immunhistochemischen Untersuchungen ebenfalls nicht die Befunde, wie sie bei humanen GBM beschrieben worden sind, bestätigen. In keinem der untersuchten Rattentumore konnte eine Überexpression des EGF-Rezeptors auf seiner Zelloberfläche gezeigt werden. Da eine Überexpression jedoch häufig im Gefolge einer Amplifikation beobachtet wird, konnte dieses Ergebnis erwartet werden.

5.1 Anforderungen an das Modellsystem

Bei dem Versuch der gentherapeutischen Beeinflussung von Tumoren des ZNS befindet sich die aktuelle Medizin noch im Therapiestadium der 1. Generation. Dies bedeutet, daß man eine Vernichtung der Tumorzellen durch das Einbringen von sog. „Suizid-Genen“, herbeizuführen sucht (s.a. Kap. 1.8).

Therapieansätze der 2. Generation befinden sich hingegen im Stadium des Experimentellen. 2. Generation bedeutet, daß versucht wird die zugrunde liegenden genetischen Defekte zu korrigieren.

Um die Forschung nach den Möglichkeiten der Beeinflussung auf diesem Gebiet weiter vorantreiben zu können, bedarf es daher geeigneter Modellsysteme. Diese Modellsysteme sollen es erlauben Hypothesen der Krebsentstehung und mögliche Therapieansätze schnell und effektiv auf ihre eventuelle Wirksamkeit zu überprüfen. Die Hauptanforderung, die dementsprechend an ein solches Modellsystem gestellt werden muß, ist eine größtmögliche Übereinstimmung zwischen Tier-Modell und humanem System hinsichtlich der genetischen Alterationen. Ein Schritt in diese Richtung stellt die vorliegende Untersuchung dar, die der Frage nach einer möglichen Amplifikation des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor nachgeht:

Kommt es in den chemisch induzierten Tumoren der Ratte zu einer Amplifikation des Gens für den EGF-Rezeptor wie sie bei einem Großteil der humanen GBM vorgefunden wird?

5.2 Kritische Bewertung der eingesetzten Methoden

Ein großes Hindernis bei der molekulargenetischen Analyse von Hirntumoren der Ratte ist das begrenzte Material das zur Verfügung steht. Aufgrund der geringen intrakraniellen räumlichen Ausdehnung der Tumoren ist nur wenig Gewebe zur

Aufarbeitung einsetzbar und die molekulargenetische Analyse von Hirntumoren der Ratte nur begrenzt möglich.

Molekulargenetische Untersuchungen müssen sich daher in der Regel auf wenige Fragen beschränken. Durch den Einsatz der PCR an chemisch-induzierten Tumoren und Transplantationstumoren der Ratte, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht diese Problematik zu umgehen. Mittels PCR können geringste Mengen genomischer und cDNA auf ein Maß amplifiziert werden, welches für analytische Verfahren benötigt wird. Hierdurch ermöglicht die PCR den Nachweis genetischer Veränderungen auf DNA-Ebene. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft genutzt, um die chem.-induzierten Tumoren und Transplantationstumoren hinsichtlich einer möglichen Amplifikation des EGFR-Gens molekulargenetisch zu charakterisieren.

Durch den direkten Vergleich mit DNA unveränderter genomischer Abschnitte, ist es mit der PCR möglich semiquantitative Analysen durchzuführen. Aussagen über die Menge eines untersuchten Gens können so gemacht und Amplifikationen auf diese Weise nachgewiesen werden.

Ein weiteres Problem, das sich aus der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Materials ergab, war die Untersuchung (post)transkriptioneller/funktioneller Veränderungen auf mRNA-Ebene. Da die Tumorgroße der intrakraniellen Transplantationstumoren bereits für die Isolation von genomischer DNA nicht ausreichend war, wurde darauf verzichtet einen Teil des Gewebes zur Extraktion von RNA zu benutzen. Daher wurden die Untersuchungen (post)transkriptioneller Veränderungen *in-vitro* durchgeführt. Die dabei eingesetzten etablierten Zelllinien leiteten sich von Nitrosoharnstoff-induzierten glialen Tumoren ab und sind in experimentellen Gentherapie-Protokollen etabliert (Saleh et al., 1996; Tapscott et al., 1994). Vor allem der letzte Punkt machte es sinnvoll diese Linien auch hinsichtlich möglicher Veränderungen auf genomischer Ebene zu untersuchen. Durch den direkten Vergleich der RNA mit sog. „housekeeping genes“ ist es in der PCR auch bei funktionellen Untersuchungen möglich, semiquantitative Analysen durchzuführen.

5.3 Untersuchungen zum EGF-Rezeptor-Gen

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse, die an durch ÄNH-induzierten Tumoren der Ratte gewonnen wurden, muß die Frage nach einer Amplifikation des Gens für den EGF-Rezeptor verneint werden.

In der dargestellten Untersuchung wurden keine Hinweise einer Amplifikation auf genomischer Ebene gefunden. Dies muß als deutlicher Unterschied zu den humanen Gliomen, bei denen die Amplifikation des Gens für den EGF-Rezeptor eine der auffälligsten Aberrationen primärer „de novo“ Gliome darstellt, hervorgehoben werden (Reifenberger et al., 1996).

An dieser Stelle soll daher zuerst der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit die untersuchten Tumoren in ihrem Ursprung und/oder histologischen Differenzierung den humanen Glioblastomen ähneln und welche Konsequenzen dies nach sich zieht. Hierbei müssen mehrere Aspekte bedacht werden.

Zum Einen ist es kaum möglich den genauen Ursprung der entdifferenzierten Tumorzellen zweifelsfrei festzustellen. Aufgrund des pränatalen Induktionszeitpunktes müßte diskutiert werden, inwieweit die Tumoren als embryonale Tumoren anzusehen sind, die eher den humanen PNETs (Primitiven neuroektodermalen Tumoren) zuzurechnen sind (Mennel, 1988). Auch Dyer und Philibote (1995) weisen darauf hin, daß für die morphologische Differenzierung die Umgebungsbedingungen des Tumorwachstums – wie sie z.B. bei der intrazerebralen Implantation der Tumoren geschaffen wird - einen wesentlichen Einfluß haben. Der fehlende Nachweis einer neuronalen Differenzierung spricht indes gegen eine Einordnung zu den embryonalen Tumoren.

Desweiteren wurde bereits eingangs erläutert, daß es auffällige molekulargenetische Unterschiede primärer – sog. „de-novo“-GBM und sekundärer, also durch Progression aus „low-grade“-Astrozytomen entstandener, GBM gibt. Da es aber nicht möglich ist, die Diagnose primäres *versus* sekundäres GBM histologisch zu stellen (Burger et al., 1987), kann hinsichtlich des Tumor-Typs unmöglich eine Aussage gemacht werden – selbst wenn davon auszugehen wäre, daß es sich bei den vorliegenden ÄNH-induzierten Tumoren histologisch um GBM handelt.

Würde es sich bei den experimentell erzeugten und transplantierten Tumoren um sekundäre GBM handeln, wäre in diesem Fall eine Mutation des p53-Gens in den

untersuchten Tumoren zu erwarten. Den sekundären GBM in ihrer Genetik vergleichbar sind die von v. Deimling et al. (1995) untersuchten Hirnstammgliome von (Klein-)Kindern, welche ebenfalls eine p53-Mutation bei fehlender Amplifikation des EGF-Rezeptors aufweisen. Ein Screening etablierter Gliom-Zelllinien auf p53-Mutationen mit Hilfe der SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) - Technik stellte allerdings weder in den untersuchten Zelllinien, noch in den Kontrollen abnorme Migrationsmuster als Hinweis auf eine Mutation dar (Schlegel et al., 1999).

Es ist demnach festzuhalten, daß die bekannten genetischen Veränderungen, speziell hinsichtlich einer Amplifikation des Gens für den EGF-Rezeptor, welche die Tumorgenese- und Progression humaner Astrozytome zu beeinflussen scheinen, in dem hier untersuchten Modellsystem keine Rolle spielen.

Auf posttranskriptioneller Ebene konnte jedoch eine alternative Spleißvariante der mRNA des EGF-Rezeptors in 2 der 5 untersuchten Tumorzelllinien C6, F98, RG2, RGL.3 und 9L nachgewiesen werden. Alle 5 Zelllinien zeigten ein 90bp großes PCR-Fragment, das mit dem Primerpaar RNEGFRA amplifiziert wurde als Ausdruck der Expression des EGF-Rezeptors-Gens. Daneben fand sich ebenfalls bei den glialen Zelllinien C6 und 9L die Expression des 170bp- großen PCR-Fragments, das mit dem Primerpaar RNEGFRNH amplifiziert wurde und ein alternativ gespleißtes Exon enthielt als Ausdruck der Expression einer alternativen Spleißvariante. Es handelt sich dabei um ein Transkript das durch ein alternativ gespleißtes Exon entsteht, das unmittelbar vor der kodierenden Sequenz der TMD lokalisiert ist. Dieses Exon weist keine Homologie zu bekannten Sequenzen anderer Spezies auf und wurde daher als "nicht-homologes Exon" bezeichnet (Petch et al., 1990). Außer in normalem Lebergewebe konnte diese Variante in adulten Lungen sowie in Placenta, Dezidua und Uterus trächtiger Ratten nachgewiesen werden (Petch et al., 1990). Welche genauen Funktionen und/oder Regulationsmechanismen dem alternativ gespleißten Rezeptor zukommen, kann mit den in der Arbeit angewandten Methoden nicht geklärt werden.

Für weiterführende funktionelle Untersuchungen wäre es hier notwendig z.B. protein-biochemische Untersuchungen anzuschließen, um das exprimierte Protein-

Produkt genauer analysieren zu können. Eine Beeinflussung der Transkription des normalen 170 kDa großen Rezeptors, wie sie von Hakjoo und Maihle (1993) für ErbB3 (s. dort) beschrieben wurde, konnte allerdings nicht bestätigt werden.

5.3.1 Bewertung der Ergebnisse im Einzelnen

5.3.1.1 Der full-length-EGF-Rezeptor

Bei humanen GBM tritt eine Amplifikation des Gens, welches für die EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase kodiert, in etwa 40% der untersuchten Fälle auf. Die Auswirkung dieser Amplifikation auf den Prozeß der Initialisierung, Malignisierung oder Progression beim GBM, ist weiterhin unklar. Eine Mitwirkung an diesen Prozessen ist jedoch wahrscheinlich, wenngleich die Bedeutung der Amplifikation noch nicht geklärt ist, bzw. nur über sie gemutmaßt werden kann. Da diese Alterationen nicht an den experimentell erzeugten Tumoren der Ratte gefunden werden konnten, kann dies als Hinweis dahingehend verstanden/gedeutet werden, daß die Tumorgenese bei der Ratte –zumindest teilweise – anderen Ursachen und Interaktionen unterliegt.

5.3.1.2 EGF-Rezeptor-Variante

Es wurde bereits erwähnt, daß in 2 der 5 glialen Tumorzelllinien ein durch alternatives Splicing generiertes PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Wie in der Einleitung berichtet, ist es der Zelle durch den Vorgang des alternativen Splicing möglich, einen verkürzten – sog. trunkierten – Rezeptor herzustellen. Aus einer einzigen Transkriptionseinheit können somit verschiedene Genprodukte exprimiert werden. Im Gegensatz zu diesem physiologischen Vorgang können alterierte Rezeptoren ebenfalls mutagen generiert werden. Eine häufige Ursache des sog. mutagenen Spleißens sind Punktmutationen in Spleißdonor/akzeptor-Stellen von Introns. Hierbei handelt es sich um AG- und GT-Signalsequenzen, die für den Vor-

gang der normalen Genexpression bedeutsam sind. Eine Punktmutation kann nun auf unterschiedliche Weise das mutagene Spleißen initiieren:

1. kann es zur Unterdrückung des eigentlichen Spleißvorganges kommen, was konsekutiv zu einem Durchlesen des Introns und somit verlängertem Exon führt,

oder

2. eine sog. kryptische (unzulässige) Spleißstelle benützt werden. Hierbei handelt es sich um Sequenzen, die der Spleißkonsensus-Sequenz ähneln, aber normalerweise nicht verwendet werden. Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle in einem Intron bewirkt den Einbau neuer Aminosäuren in das Protein, wohingegen die Verwendung in einem Exon zu einer Deletion führt. Richard und Beckmann (1995) zeigten, daß die Aktivierung einer solchen Spleißstelle pathogen wirken kann.

Verschiedene durch mutagenes Splicing entstandene Rezeptoren sind mittlerweile bekannt. Bei ihnen kann es sich sowohl um eine transmembranöse Form (Yamazaki et al., 1988; Nagane et al., 1996; Prigent et al., 1996) – wie im Fall des delta 2-7-EGF-Rezeptors – handeln, als auch um einen löslichen, nur aus der extrazellulären (Liganden-bindenden-) Domäne bestehenden Rezeptor (Weber und Gill, 1984; Basu et al., 1989; Petch et al., 1990; Lax et al., 1991; Maihle et al., 1991; Ekstrand et al., 1992; Ilekis et al., 1995; Reiter et al., 1996; Hakjoo and Maihle, 1998). Scott et al. (1993) beschrieben neben einem extrazellulären Protein, auch ein intrazelluläres Transkript des HER2-Gens (neu/ErbB2). Allen diesen Rezeptor-Varianten ist gemein, daß sie nicht durch das bereits erwähnte alternative Splicing generiert wurden, sondern durch Mutation entstanden sind, weshalb im Folgenden auch von mutagenem Splicing gesprochen werden soll.

So vielgestaltig die Struktur der EGF-Rezeptor-Variante sein kann, so vielgestaltig sind auch die bislang beobachteten biologischen Funktionen und deren denkbare zellphysiologischen Konsequenzen. Flickinger et al. (1992) konnten an CEF (chik-

ken embryo fibroblast)-Zellen zeigen, daß die TGF- α -abhängige Koloniebildung bei CEF-Zellen in Soft-Agar durch eine 70 kDa (2.6 kb mRNA) große ECD des EGF-Rezeptors blockiert werden konnte. Welcher genaue Mechanismus hinter dieser Blockade steht ist noch nicht genau bekannt; denkbar wäre jedoch, daß dies entweder durch a) direkte Konkurrenz mit TGF- α geschieht, b) die Dimerisierung der Rezeptoren blockiert wird oder c) die trunkierte Form als intrazellulärer Antagonist wirkt.

Basu et al. (1989) machten eine weitere mögliche Funktion des trunkierten EGF-Rezeptors aus. Sie stellten in ihren Untersuchungen fest, daß die Tyrosin-Kinase-Aktivität des intakten "full-length"-Rezeptors durch die alterierte 100 kDa große Rezeptor-Form sowohl in ihrer basalen, wie auch in der EGF-abhängigen Kinase-Aktivität inhibiert werden kann. Es wird angenommen, daß es dem trunkierten EGF-Rezeptor möglich ist durch Heterodimerisierung mit dem vorübergehend ruhenden full-length-Rezeptor-Monomer ein stabiles ruhendes Heterodimer zu bilden. Der trunkierte Rezeptor kann hierdurch verhindern, daß sich ein aktives Rezeptor-Monomer bzw. Heterodimer ausbildet und damit konsekutiv zu einer Inhibierung der Kinase-Aktivität führen. Man spricht in diesem Zusammenhang von sog. *non-functional dimerisation*.

Ebenso wurde von O'Rourke (1997) berichtet, durch den Transfer der extrazellulären neu-Domäne – hierbei handelt es sich um die onkogene Form des ErbB-2-Rezeptors - in EGF-Rezeptor-produzierenden GBM-Zellen eine Inhibierung der Phenotyp-Transformation zu erreichen. Desweiteren konnten hierdurch Zellwachstum und Proliferationsverhalten wieder auf ein physiologisches Niveau gebracht werden. Durch Heterodimerisierung zwischen neu-Ektodomäne und "full-length"-EGF-Rezeptor konnte die Fähigkeit Tumoren auszubilden in athymischen Mäusen herabgesetzt werden und eine Inhibierung der EGF-induzierten DNA-Synthese beobachtet werden.

Hakjoo und Maihle konnten 1993 eine weitere interessante Beobachtung machen. Sie berichten über 5 Transkripte unterschiedlicher Größe (1.4 kb, 1.6 kb, 1.7 kb, 2.1 kb, 2.3 kb), die durch Alteration der 6.2 kb großen "full-length"-c-erbB3-Rezeptor-mRNA generiert worden sind. ErbB-3, wie auch ErbB-2 und ErbB-4 sind ebenfalls Tyrosin-Kinasen (s.o.), die gemeinsam mit dem EGF-Rezeptor zur ErbB-Rezeptor-Familie gehören.

Ratio-Messungen zwischen alteriertem und full-length-Rezeptor zeigten, daß die gesteigerte Transkription einer 1.4 kb großen mRNA zu einer Reduzierung der "full-length"-Rezeptor-mRNA mit konsekutiv verminderter Expression des Rezeptors führte. Durch die Synthese alternativer c-erbB3-mRNA kann auf diese Weise die Transkription der full-length-c-erbB3-mRNA reduziert und hierdurch auf die Signaltransduktion der Zelle Einfluß genommen werden.

Eine weitere Möglichkeit die Signaltransduktion zu modulieren, geschieht durch die Bindung von *neuregulin* an die alterierten Transkripte. *neuregulin* führt unter physiologischen Umständen am ErbB-3-Rezeptor (s.o.) zu einer Konformationsänderung, durch welche es zu einer Heterodimerisierung mit ErbB-4 (s.o.) kommt. Dieses ErbB-3/ErbB-4-Heterodimer führt an der Zelle zu Proliferation und/oder Differenzierung.

Somit könnte über die Expression einzelner alterierter c-erbB3-Transkripte eine das Wachstum regulierende Kontrolle ausgeübt werden.

Diese Beobachtung kann in der vorliegenden Untersuchung allerdings nicht bestätigt werden. Durch den Vergleich der Bandenmuster von full-length und gespleißtem Rezeptor erscheint der Mechanismus der Herunter-Regulierung als zellbiologische Funktion sich hier nicht zu bestätigen. Die Expression einer alterierten Variante ist nach den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit ohne regulierenden Einfluß auf den full-length-Rezeptor. Es darf daher angenommen werden, daß eine das Wachstum regulierende Funktion – soweit vorhanden - nicht durch die gleichen Mechanismen erzielt wird, wie sie von Hakjoo und Maihle für die alterierten c-erbB3-Transkripte angenommen wird.

Interessant ist ebenfalls die Entdeckung eines Proteins mit "Mitogen-inhibierender Aktivität" ("mitogen inhibitory activity") für Astrozyten, das aus Hirn-, Leber- und auch anderen Gewebsextrakten adulter Ratten gewonnen und mit anti-EGF-Rezeptor-Antikörpern neutralisiert werden konnte (Nieto-Sampedro, 1988; Nieto-Sampedro 1989). Diese Molekül - "EGFR-related inhibitor (ERI)" genannt - scheint die Fähigkeit zu besitzen, EGF-vermittelte Effekte zu blockieren. Aufgrund Protein-biochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um Anteile der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors handelte, welche vermutlich von astroglialen Zellen sezerniert wird. Diskutiert wird daher eine Rolle derartiger EGF-Rezeptorvarianten bei der mitogenen Rekrutierung von Astrozyten

im Rahmen reaktiver Prozesse. So konnte gezeigt werden, daß in der Umgebung von experimentell induzierten Verletzungen des Hirnparenchyms eine deutliche Reduktion der ERI-Aktivität auftrat und es konsekutiv zu einer kräftigen astroglialen Reaktion kam. Wird gleichzeitig ein EGF-Rezeptor-Antikörper dazugegeben, kann dieser Effekt erheblich gesteigert werden (Nieto-Sampedro, 1988; Nieto-Sampedro, 1989).

Es ist jedoch nicht klar, ob es sich bei ERI um die Spleißvariante des non-homologen Exons (Petch et al., 1990) handelt, die in zwei der fünf Zelllinien der vorliegenden Arbeit nachzuweisen war.

Eine weitere denkbare Funktion der inhibitorischen Effekte alterierter EGFR-Varianten, wie sie auf den letzten Seiten durch zahlreiche experimentelle Daten beschrieben wurden, wäre die Möglichkeit, daß es durch die Expression eines alterierten Rezeptor-Proteins zu einer Erhöhung des Selektionsdruck auf die Zelle käme. Dieser würde möglicherweise konsekutiv die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens bedingen und somit die z.T. erhebliche Anzahl von Kopien der amplifizierten Gene in humanen Tumoren erklären (Schlegel et al., 1994a).

Neben diesen in erster Linie inhibitorischen Effekten eines alterierten EGF-Rezeptors sind hingegen auch Effekte beschrieben worden, die in Richtung einer Proliferations- und Transformationssteigerung hinweisen. So zeigten Scott et al. (1993) eine Resistenz gegen Wachstums-inhibierende Effekte des HER2-Antikörpers (HER = human EGF receptor) in Zusammenhang mit einer extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptor. Eine weitere mögliche Funktion, welche dem von uns nachgewiesenem Rezeptor zukommen könnte, ist die Potenzierung des biologischen Signals durch die Unfähigkeit dieses Signal durch den Vorgang der Rezeptor-Internalisierung zu beenden. Chen et al. (1987) und auch Well (1990) konnten zeigen, daß sog. Internalisierungs-Mutanten, welchen in der C-terminalen Domäne der Bereich der Aminosäure-Region 991 - 1022 fehlt, einen erhöhten Mitose Index aufwiesen, da es nicht zu einer Abschwächung des biologischen Signals mittels Internalisierung kommen kann.

Als eine weitere denkbare Möglichkeit der Interaktion des alterierten EGF-Rezeptors wäre Folgendes in Erwägung zu ziehen:

Derynck (1984) sowie Tang (1997) berichteten über ein verstärktes Proliferationsverhalten EGF-Rezeptor-exprimierender NRK (normal rat kidney)-Zellen, bzw. hu-

maner Gliomzellen unter TGF- α -Stimulation. Der natürliche Rezeptor des TGF- α ist ebenfalls der EGF-Rezeptor, um den TGF- α mit EGF konkurrieren muß. Würde das endogene EGF nun durch eine lösliche, sekretierte EGF-Rezeptor-Variante selektiver als TGF- α gebunden und somit in der Möglichkeit der Signaltransduktion gehemmt, könnte dies einer relativen Vermehrung von TGF- α gleichgesetzt werden. Konsekutiv käme es zu einer Signaltransduktionssteigerung über den EGF-Rezeptor/TGF- α -Signalweg. Sizeland (1992) und auch Normanno (1996) konnten durch eine Zerstörung dieses Signalweges das Wachstum von Gliomen und anderen Tumoren signifikant senken, was die Bedeutung dieses Systems bei der Tumorgenese zu bestätigen scheint.

Von Flickinger (1992) und Maihle (1991) wird desweiteren noch die Möglichkeit diskutiert, daß eine trunkierte Rezeptorform eine Reservoirfunktion für Wachstumsfaktoren darstellen wie auch eine Verlängerung der HWZ bedingen könnte. Konsekutiv würde dies zu einer verstärkten und/oder verlängerten biologischen Aktivität und hochreguliertem Proliferationsverhalten der Empfängerzelle führen. Baumann et al. (1989) konnten nachweisen, daß ein kovalent gebundener Wachstumshormon-Bindungsprotein-Komplex weniger schnell aus dem Blut eliminiert wird, als z.B. freies Wachstumshormon wie auch, daß die Degradationsrate der Wachstumsfaktoren durch Komplexierung mit Bindungsproteinen wesentlich reduziert wurde.

Ilekis et al. (1995) berichten von einem 80 kDa-Rezeptor-Protein, welches in humanen Trophoblasten gefunden wurde und das erste in normalem humanen Gewebe vorliegende EGF-Rezeptor-like-Protein darstellt. Seine mögliche Funktion wird in der Konkurrenz mit EGF-Rezeptor um potentielle Liganden – EGF, TGF- α - diskutiert.

So unterschiedlich die Mechanismen der alterierten EGF-Rezeptoren sind, kann doch etwas vereinfachend festgehalten werden, daß ihre Hauptfunktion in einer Modulation oder Beeinflussung des Proliferations- und Transformationsverhaltens liegt.

Um die Bedeutung des von mir in den glialen Zelllinien nachgewiesenen Rezeptors beurteilen zu können, muß Folgendes bedacht werden:

1.: der von mir dargestellte Rezeptor entspricht der von Petch (1990) beschriebenen Variante und stellt somit wohl den physiologischen Vorgang des alternativen Spleißens dar. Er muß daher von den Rezeptorvarianten abgegrenzt werden, die durch mutagenes Splicing generiert werden. Die hier beschriebene Variante wurde von Petch in normalem Leber-, Dezidua und Ovarialgewebe beschrieben, weshalb für diese Form des EGF-Rezeptors eher physiologische Funktionen und Effekte angenommen werden dürfen.

2.: Ekstrand et al. (1992) fanden in ihren Untersuchungen an 32 humanen GBM (WHO Grad IV), daß die Amplifikation des EGF-Rezeptors eine Voraussetzung für den Vorgang der Alteration desselben darstellt. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In zwei der fünf glialen Zelllinien konnte eine Alteration des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden, obwohl eine gleichzeitige Amplifikation nicht beobachtet wurde. Einschränkend ist hier jedoch zu bemerken, daß die Rezeptor-Alterationen, welche von Ekstrand beschrieben wurden, wohl nicht mit jener in der vorliegenden Arbeit strukturell verglichen werden können, da es sich – wie oben beschrieben – um eine physiologische Variante und nicht eine mutagen bedingte Alteration handelt. Mit Vorsicht soll daher in der vorliegenden Arbeit behauptet werden, daß das Auftreten der beschriebenen Rezeptor-Variante nicht mit der Tumorgenese assoziiert zu sein scheint, sondern eher physiologische Funktionen erfüllt, evtl. sogar nur ein Epiphänomen darstellt.

5.4 Abschließende Zusammenfassung der Einzelergebnisse

Zusammenfassend ergibt der Vergleich der Daten der humanen und der experimentellen glialen Tumoren also einen entscheidenden Unterschied hinsichtlich der genetischen Kontrolle der EGF-Rezeptor-Signalwege. Während eine große Anzahl humaner GBM genetische Aberrationen des EGF-Rezeptor-Gen, wie auch Rezeptor-Überexpressionen aufweisen, finden sich in den chemisch induzierten Gliomen der Ratte keine den EGF-Rezeptor betreffenden Veränderungen.

Der Nachweis alternativer Spleißvarianten in den experimentellen Tumoren entspricht eher einer physiologischen Regulation der EGF-Rezeptor-Signalwege; dies wiederum steht in krassem Gegensatz zu der erheblich gestörten Signaltransduktion in humanen GBM (Hoi Sang et al., 1995a; Hoi Sang et al., 1995b).

Die Auswirkungen, welche die Expression der alternativen Spleißvariante in zwei Zelllinien der vorliegenden Arbeit haben könnte, sind nicht klar, scheinen aber nicht auf einen Effekt des Karzinogens zurückzuführen zu sein. Vielmehr könnte das Auftreten des Transkriptes proliferationsabhängig sein und auf bestimmte Phasen des Zellzyklus beschränkt auftreten (Schlegel et al., unveröffentlicht). Generell kann postuliert werden, daß der Zelle durch die Fähigkeit des alternativen Splicing die Möglichkeit gegeben ist, modulierend auf die Proliferations- und/oder Differenzierungsfähigkeit einzuwirken. Die genaue Untersuchung der biologischen Funktion alternativ gespleißter Varianten des EGF-Rezeptors in experimentellen Gliomen der Ratte muß weiteren eingehenden molekularbiologischen Experimenten vorbehalten bleiben.

5.5 Bedeutung der Ergebnisse für das vorliegende Modellsystem

Abschließend muß nun die Frage gestellt werden, welche Konsequenzen aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gezogen werden müssen.

5.5.1 Was müssen Modellsysteme leisten?

Modellsysteme sollen die Möglichkeit schaffen im Rahmen aktueller Forschung neue Therapieansätze – die ob ihres oftmals noch rein hypothetischen Charakters nicht am Menschen überprüft werden können und dürfen – zu erproben und ggf. zu validieren. Grundvoraussetzung für eine spätere vergleichbare Therapie ist eine größtmögliche Übereinstimmung der beiden Systeme.

So werden von Petersen (1994) an ein experimentelles Model u.a. folgende Anforderungen gestellt:

- Die neoplastischen Zellen müssen glialer Herkunft sein,
- Tumorrare und Malignitätscharakteristika sollten vorhersagbar und reproduzierbar sein,
- das Versuchstier sollte kostengünstig in der Haltung und in großen Mengen verfügbar sein,
- das Versuchssystem sollte kurze Induktionszeiten sowie standardisierte Überlebenszeiten aufweisen,
- der Tumor sollte ein gliomartiges, intraparenchymales Wachstum zeigen und bezüglich Infiltration und Neovaskularisation vergleichbar sein,
- der Tumor darf nicht in extraneurale Gewebe metastasieren,
- der Tumor muß *in-vitro* kultivierbar und ungefährlich für das Laborpersonal sein.

Will man der Entwicklung neuerer Therapieansätze wie z.B. der Gen- und Immun-Therapie Rechnung tragen, muß eine weitere Forderung an ein experimentelles Tiermodell hinzugefügt werden – nämlich die Vergleichbarkeit hinsichtlich molekulargenetischer Veränderungen. Konkret wäre also zu fordern, daß ein mit der humanen Neuroonkologie vergleichbares Modellsystem, gerade im Bereich der molekulargenetischen Veränderungen weitgehende Konformität aufweisen müßte.

5.5.2 Was leisten aktuelle Modellsysteme?

Zwei Typen von Systemen sind hier in erster Linie zu unterscheiden; einerseits die genetisch charakterisierten, andererseits jene, die (noch) nicht genetisch definiert sind.

Zu den zuerst genannten zählen die transgenen sowie die „knock-out“-Modelle, deren evidentester Nachteil darin liegt, daß sie keine glialen Tumoren ausbilden (Wiestler et al. 1992b). Ein weiterer Nachteil liegt in der Tatsache, daß lediglich ein geringer Prozentsatz von 5% der Nachkommen die gewünschten Transgene tragen und in dem erwarteten Gewebe exprimieren (Hanahan, 1989). Sie stellen daher kein geeignetes Modell für gliale Tumoren dar.

Die chemisch-induzierten Modelle weisen zwar morphologisch eine gute Übereinstimmung mit humanen glialen Tumoren auf, weshalb sie für morphologische und biologische Untersuchungen geeignet sind (Yoshida und Gravioto, 1978), wurden aber bislang hinsichtlich der (wesentlichen) genetischen Veränderungen nicht untersucht. Die einzelnen Modelle kranken demnach an der Nichterfüllung elementarer Voraussetzungen. In wieweit diese Tatsache den Einsatz chemisch-induzierter Tumoren einschränkt, soll im Folgenden diskutiert werden.

5.6 Bewertung des chemisch-induzierten Modellsystems

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, liegen die Hoffnungen und Anstrengungen momentan auf dem Gebiet der Chemo- und Gentherapie, weshalb diese Therapieansätze hinsichtlich ihrer Effektivität an transplazentar durch Nitrosoharnstoff induzierten und daraus abgeleiteten Transplantattumoren der Ratte gemessen werden sollte. Entsprechende Chemotherapie-Ansätze zeigen hierbei ein den humanen Gliomen vergleichbares Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie und haben sich daher in der Vergangenheit durchaus bewährt.

Was die Einsatzmöglichkeit in der Gen-Therapie angeht, so muß hier zwischen Gen-therapeutischen Strategieformen der 1. und 2. Generation unterschieden werden. Während Therapien der 1. Generation versuchen durch das Einbringen von sog. „Suizid-Genen,, den vorzeitigen Zelltod herbeizuführen, zielen Therapie-Strategien der 2. Generation daraufhin den zugrunde liegenden molekulargenetischen Defekt zu beheben. Therapie-Modelle der 1.Generation unterliegen daher keinen oder nur geringen Einschränkungen, wie sie z.B. durch den Einsatz von humanpathogenen Viren zum Tragen kämen. Ansonsten sind die retroviralen Transfektionsmethoden durchaus einsetzbar.

Bei den Therapie-Strategien der 2. Generation stellt sich die Situation anders dar. Ein einsetzbares Modellsystem müßte hier eine (nahezu) 100%ige Übereinstimmung mit den molekulargenetischen Veränderungen humaner Gliome aufweisen. Setzt man dieses Kriterium als unabdingbar voraus – und das muß man streng genommen – so ist das Modell der chemisch-induzierten Tumoren als ungeeignet einzustufen, da es keine der bei humanen Gliomen nachweisbaren Alterationen

und Veränderungen aufweist. In diesem Zusammenhang sind jedoch zwei Anmerkungen zu machen.

1. muß man sich vergegenwärtigen, daß es zum aktuellen Zeitpunkt noch kein Modellsystem gibt, daß den Anforderungen gerecht wird, weswegen man sich Experiment-spezifisch für oder gegen ein bestimmtes vorhandenes Modellsystem entscheiden muß.
2. ist nicht nur die fehlende Übereinstimmung vorhandener Modelle für das Dilemma der Nichtvergleichbarkeit verantwortlich, sondern in gleichem Maße auch unser momentan noch mangelhaftes und rudimentäres Wissen von der Tumorentstehung und Tumorprogression. Solange die großen Geheimnisse hier nicht entschlüsselt sind, wird es weiterhin schwierig sein, geeignete Modellsysteme zu entwickeln und den Krebs – gleich welchen Organs – wirksam zu bekämpfen, was aber das Ziel sein sollte.

6 Zusammenfassung

Das GBM (WHO Grad IV) stellt mit einer Inzidenz von ca. 15% den häufigsten aller primären Hirntumoren dar. Trotz konzertierter Studien und Untersuchungen konnten keine Fortschritte in der Behandlung und Prognoseverbesserung dieses hochmalignen Tumors erzielt werden. Zur Testung und Validierung aktueller wie auch zukünftiger Therapiestrategien sind übertragbare Modellsysteme daher notwendig.

Die Untersuchung Nitrosoharnstoff-induzierter und durch Transplantation überimpfter Tumoren der Ratte mit Hilfe der PCR konnte keine Amplifikation des Gens für den Epidermalen Wachstumsfaktor nachweisen. Immunhistochemische Untersuchungen wurden mit der PAP-Methode an in Paraffin eingebetteten Semidünnschnitten durchgeführt. An der Zelloberfläche von Tumorzellen konnte hierdurch keine Überexpression des EGF-Rezeptor-Proteins nachgewiesen werden.

An glialen Zelllinien durchgeführte Untersuchungen der mRNA mittels RT-PCR wiesen bei zwei Zelllinien eine lösliche, alternativ gespleißte Rezeptorvariante nach. Die Expression einer alternativ gespleißten Rezeptorvariante bedingte allerdings keine Herunter-Regulierung des endogenen full-length-Rezeptors.

In der vorliegenden Arbeit konnten die bekannten molekulargenetischen Veränderungen humaner GBM in den experimentellen Tumoren der Ratte nicht nachgewiesen und bestätigt werden. Es konnte weder eine Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens, noch eine Überexpression des EGF-Rezeptors gezeigt werden. Welche Bedeutung der alternativ gespleißten Variante des Rezeptors zukommt, muß protein-chemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben. Trotz fehlender molekulargenetischer Übereinstimmung hinsichtlich der Aberrationen bei humanen und rodenten Gliomen, ist das Modellsystem chemisch-induzierter und Transplantattumoren weiterhin brauchbar. Allerdings sollte die Eignung weiterer etablierter Systeme bei bestimmten Fragestellungen im Einzelfall entschieden werden.

7 Literaturverzeichnis

A

Aas AT, Brun A, Blennow C, Strömblad S, Salford LG (1995). The RG2 rat glioma model. *J Neurooncol* 23: 175-183

Alitalo K, Schwab M (1986). Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res* 47: 235-281

Ammirati M, Vick N, Liao YL, Ciric I, Mikhael M (1987). Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 21: 201-206

Anklesaria P, Teixido J, Laibo M, Pierce JH, Greenberger JS, Masaque J (1990). Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor- α to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3289-3293

B

Bamberg M, Hess CF, Kortmann RD, (1996). Zentralnervensystem. In: Scherer E, Sack H, eds. Strahlentherapie: Radiologische Onkologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer: 763-808

Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RS (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319: 226-230.

Baselga J, Mendelsohn J (1994). Receptor blockade with monoclonal antibodies as anti-cancer therapy. *Pharmacol Ther* 64: 127-154

Basu A, Raghunath M, Bishayee S, Das M (1989). Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol Cell Biol* 9: 671-677

Baumann G, Shaw MA, Buchanan TA (1989). In vivo kinetics of a covalent growth hormone-binding protein complex. *Metabolism* 38:330-333

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371

Bigner SH, Burger PC, Wong AJ, Werner MH, Hamilton SR, Muhlbaier LH, Vogelstein B, Bigner DD (1988). Gene amplification in malignant human gliomas: clinical and histopathological aspects. *J Neuropathol Exp Neurol* 47: 191-203

Boing C C (1993). Cancer statistics 1993. *CA Cancer J Clin* 43: 7

Böni-Schnetzler M, Pilch PF (1987). Mechanism of epidermal growth factor receptor autophosphorylation and high-affinity binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7832-7836

Brachmann R, Linquist PB, Nagashima M, Kohr W, Lipari T, Napier M, Derynck R (1989). Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF- α receptors. *Cell* 56: 691-700

Bubenik J, Voitenok NN, Kieler J, Prassolov V, Chumakov PM, Bubenikova D, Simova J, Jandlova T (1988). Local administration of cells containing an inserted IL-2 gene and producing IL-2 inhibits growth of human tumors in nu/mu. *Immunol Lett* 19: 279-282

Burger PC, Green SB (1987). Patient age, histological features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59: 1617-1625

C

Carpenter G (1987). Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 56: 881-894

Catterton WZ, Escobedo BN, Sexson WR, Gray ME, Sundell HW, Stahlman MT (1979). Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits. *Pediatr Res* 13: 104-108

Chang CH, Horton J, Schoenfeld , Salazar O, Perez-Tamay R, Kramer S, Weinstein A, Nelson J, Tsukada Y (1993). Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. *Cancer* 52: 997-1007

Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS (1992). Costimulation of antitumor immunity by the B7-counterreceptor for the T-lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71: 1093–1102

Chen WS, Lazar CS, Lund KA, Wesh JB, Chang CP, Walton GM, Der CJ, Wiley HS, Gill GN, Rosenfeld MG (1987). Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalisation and calcium regulation. *Cell* 59: 33-43

Clark AJ, Ishii S, Richert N, Merlino GT, Pastan I (1985). Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8374-8378

Cohen S, Carpenter G, King L Jr (1980). Epidermal growth factor-receptor-kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255: 4834-4842

Collins VP (1993). Amplified genes in human gliomas. *Sem Cancer Biol* 4: 27-32

Connors TA (1995). The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther* 2: 213–233

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to the EGF receptor shares chromosomal localization with neu oncogene. *Science* 230: 1132-1139

Culver KW, Van Gilder J, Link CJ, Carlstrom T, Buroker T, Yuh W, Koch K, Schabold K, Doornbas S, Wetjen B et al. (1994). Gene therapy for the treatment of malignant brain tumors with in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine gene/ganciclovir system. *Hum Gene Ther* 5: 343 – 379

D

Daneyemez M, Gezen F, Canakci Z, Kahraman S (1998). Radical surgery and reoperation in supratentorial glial tumors. *Minim Invasive Neurosurg* 41(4): 209-213

Davis FG, Freels S, Grutsch J, Barlas S, Brem S (1998). Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg* 88: 1-10

Davis FG, McCarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML (1999). The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors. *Cancer* 85: 485-491

Dembinski AB, Johnson LR (1985). Effect of epidermal growth factor on the development of rat gastric mucosa. *Endocrinology* 116: 90-94

Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV (1984). Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in E. coli. *Cell* 38: 287-297

Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, Schlessinger J, Aaronson SA (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-independent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 51: 1063-1070

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA (1987). The carboxy-terminal domains of the erbB-2 and epidermal growth factor receptor exert different regulatory effects on intrinsic receptor tyrosine kinase function and transforming activity. *Mol Cell Biol* 10: 2749-2756

Di Fiore PP, Segatt O, Taylor WG, Aaronson SA, Pierce JH (1990). EGF receptor and erbB-2 tyrosine kinase domains confer cell specificity for mitogenic signaling. *Science* 248: 79-83

Downyard J, Yarden Y, Mayes E, Scrase G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. *Nature* 307: 521-527

Druckrey H, Ivanovivic S, Preußmann R (1964). Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrosoharnstoff. *Naturwissenschaften* 50: 144

Druckrey H, Ivanovivic S, Preußmann R (1966). Teratogenetic and carcinogenic effects in the offspring after a single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature* 210: 1378-1379

Druckrey H, Ivanovivic S, Preußmann R, Landschütz C, Steckar J, Brunner U, Schagen B (1968). Transplacental Induction of neurogenic malignomas by 1,2-Diethylhydrazine, azo- and azoxy-ethane in rats. *Experientia* 24: 561-562

Durmaz R, Erken S, Arslantas A, Atasoy MA, Bal C, Tel E (1997). Management of glioblastoma multiforme: with special reference to recurrence. *Clin Neurol Neurosurg* 99(2): 117-123

Dyer CA, Philibotte T (1995). A clone of the MOCH-1 glial tumor in culture: multiple phenotypes expressed under different environmental conditions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 852-863

E

Earp HS, Austin KS, Blaisdell J, Rubin RA, Nelson KG, Lee LW, Grisham JW (1986). Epidermal growth factor (EGF) stimulates EGF receptor synthesis. *J Cell Biol* 107: 4777-4780

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4309-4313

F

Faillot T, Magdelenat H, Mady E, Stasiecki P, Fohanno D, Gropp P, Poisson M, Delattre JY (1996). A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* 39(3):478 - 83

Fine H A (1994). The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J Neuroonc* 20: 111

Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS, Black PL, Canellos GP (1993). Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71(8): 2585 - 2597

Flickinger TW, Maihle NJ, Kung HJ (1992). An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. *Mol Cell Biol* 12: 883-893

Friend SH, Dryja TP and Weinberg RA (1988). Oncogenes and tumor-suppressing genes. *New England Journal of Medicine* 318: 618 - 622

G

Garcia JV, Gehm BD, Rosner MR (1989). An evolutionarily conserved enzyme degrades transforming growth factor-alpha as well as insulin. *J Cell Biol* 109: 1301-1307

Gill GN, Weber W (1987). Purification of functionally active epidermal growth factor receptor protein using a competitive antagonist monoclonal antibody and competitive elution with epidermal growth factor. *Methods Enzymol* 146: 82-8

Goth R, Rajewsky MF (1974). Molecular and cellular mechanisms associated with pulse carcinogenesis in the rat nervous system by ethylnitrosourea: Ethylation of nucleic acids and elimination rates of ethylated bases from the DNA of different tissues. *Z. Krebsforsch* 82 :37

Goth R, Rajewsky MF (1974). Persistence of O⁶-ethylguanine in rat brain DNA: Correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc. Natl Acad Sci USA* 71: 639-643

Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A (1997). Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene* 15:2755-65

Gundersen S, Lote K, Watne K (1998). A retrospective study of the value of chemotherapy to surgery and radiotherapy in grade 3 and 4 gliomas. *Eur J Cancer* 34(10): 1565-1569

H

Hakjoo L, Maihle NJ (1998). Isolation and characterization of four alternate c-erbB3 transcripts expressed in ovarian carcinoma-derived cell lines and normal human tissues. *Oncogene* 16: 3243-3252

Haley J, Whittle N, Bennet P, Kinchington D, Ullrich A, Waterfield M (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* 1: 375-396

Hanahan D (1989). Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 246: 1265-1275

Hayman MJ, Enrietto PJ (1991). Cell transformation by epidermal growth factor receptor and v-erbB. *Cancer Cell* 8: 302-307

Heuser K (1990). Chemotherapie bei malignen Gliomen. *Neurochirurgia* 33: 20-22 (Supplement I)

Hoi Sang U, Espiritu OD, Kelley PY, Klauber MR, Hatton JD (1995a). The role of the epidermal growth factor receptor in human gliomas: I. The control of cell growth. *J Neurosurg* 82: 841-846

Hoi Sang U, Espiritu OD, Kelley PY, Klauber MR, Hatton JD (1995b). The role of the epidermal growth factor receptor in human gliomas: II. The control of glial process extension and the expression of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosurg* 82: 847-857

Honegger AM, Schmidt A, Ullrich A, Schlessinger J (1990). Evidence of epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4035-4044

Hurt MR, Moossy J, Donovan-Peluso M, Locker J (1992). Amplification of epidermal-growth-factor-receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis. *J Neuropathol exp Neurol* 51: 84-90

Hynes NE (1993). Amplification and overexpression of the erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for cancer therapy? *Sem Cancer Biol* 4: 19-27

I

Ilekis JV, Stark BC, Scoccia B (1995). Possible role of variant transcripts in the regulation of epidermal growth factor receptor expression in human placenta. *Molecular Reproduction and Development* 41: 149-156

Innis MA, Gelfand DH (1990). Optimization of PCRs In: *PCR Protocols*, A guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds.) pp. 3-13. Academic Press; Inc., San Diego.

J

James CD, Carlom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK (1989). Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad USA* 86: 2858-2862

Junier MP, Hill DF, Costa ME, Felder S, Ojeda SR (1993). Hypothalamic lesions that induce female precocious puberty activate glial expression of the epidermal growth factor receptor gene: differential regulation of alternatively spliced transcripts. *J Neurosci* 13: 703-713

K

Kallio M, Sankila R, Jääskeläinen J, Karjalainen S, Hakulinen T (1991). A population-based study on the incidence and survival rates of 3857 glioma patients diagnosed from 1953 to 1984. *Cancer* 68: 1394-1400

Kayne AH, Laws ER Jr. (1995). Historical Perspective, *Brain Tumors*, Churchill Livingstone, Edinburgh Hong Kong London Madrid Melbourne New York and Tokyo: 3-8

Kimler BF (1994). The 9L rat brain tumor model for pre-clinical investigation of radiation-chemotherapy interactions. *J Neurooncol* 20: 103-109

Kirkegaard P, Olsen PS, Poulsen SS, Nexø E (1983). Epidermal growth factor inhibits cysteamine-induced duodenal ulcers. *Gastroenterology* 85: 1277-1283

Klapper LN, Vaisman N, Hurwitz E, Pinkas-Kramarski R, Yarden Y, Sela M (1997). A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to Erb-2/Her2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene* 14: 2099–2109

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3: 255-68

Klein G (1987). The approaching era of tumor suppressor genes. *Science* 238: 1539 - 1545

Knudson AG Jr (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-3

Ko L, Koestner A, Wechsler W (1980a). Characterization of cell cycle and biological parameters of transplantable glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol* 51: 107-111

Ko L, Koestner A, Wechsler W (1980b). Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol* 51: 23-31

Koestner A (1978). Neurogenetic tumors, animal model of human disease. *Comparative Pathology Bulletin* 10: 2-3

Koestner A, Swenberg JA, Wechsler W (1972). Experimental tumors in the nervous system induced by resorptive N-nitroso-compounds. *Prog Exp Tumor Res* 17: 9-13

Kristt DA, Reedy E, Yarden Y (1993). Receptor tyrosin kinase expression in astrocytic lesions : similar features in gliosis and gliomas. *Neurosurgery* 33: 106-115

Kristt DA, Yarden Y (1996). Differences between phosphotyrosine accumulation and Neu/ErbB-2 receptor expression in astrocytic proliferate processes. *Cancer* 15: 1272-1283

L

Laerum OD, Rajewsky MF (1975). Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo. *J Natl Cancer Inst* 55: 1177-1187

Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW (1994). Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81(3):427-36

Lax I, Burgess WH, Bellot F, Ullrich A, Schlessinger J, Givol D (1988). Localization of major receptor-binding domain for epidermal growth factor by affinity labeling. *Mol Cell Biol* 8: 1831-1834

Lax I, Mitra AK, Ravera C, Hurwitz DR, Rubinstein M, Ullrich A, Stroud RM, Schlessinger J (1991). Epidermal growth factor (EGF) induces oligomerization of soluble, extracellular, ligand-binding domain of EGF-receptor. *J Biol Chem* 266: 13828-13833

Lee CC, Caskey CT (1990). cDNA cloning using degenerate primers. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds.) pp. 46-53. Academic Press; Inc., San Diego

Leenstra S, Oskam NT, Bijleveld EH, Bosch DA, Troost D, Hulsebos TJ (1998). Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival. *Int J Cancer* 79(2):159-65

Leon SP, Jiguang Zhu BS, (1994). Genetic Aberrations in Human Brain Tumors. *Neurosurg* 34:708-717

Lemmon MA, Schlessinger J (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TIBS* 19: 459-463

Levin VA, Gutin PH, Leibel S (1993). Neoplasms of the central nervous system, In: DeVita Jr VT, Hellmann S, Rosenberg SA (eds). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 1679-1737, Lippincott Co, Philadelphia

Lin C, Chen WS, Kruiger W, Stolarsky LS, Weber W, Evans RM, Verma IM, Gill GA, Rosenfield MG (1984). Expression cloning of EGF receptor complementary DNA: Gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. *Science* 224: 843-848

M

Magee PN (1968). The possible significance of alkylation in carcinogenesis. *N Z Med J* 67:Suppl: 59-72

Magee PN, Barnes JM (1956). The production of malignant hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Cancer* 10: 114-122

Maihle NJ, Flickinger TW, Raines MA, Sanders ML, Kung HJ (1991). Native avian c-erbB gene expresses a secreted protein product corresponding to the ligand-binding domain of the receptor. *Proc Natl Sci USA* 88: 1825-1929

Malden LT, Novak U, Kaye AH, Burgess AW (1988). Selective amplification of the cytoplasmatic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 48: 2711-2714

Margison GP, Kleihues P (1975). Chemical carcinogenesis in the nervous system. *Biochem J* 148: 521-525

Margolis B, Li N, Koch A, Mohammadi M, Hurwitz DR, Zilberstein A, Ullrich A, Pawson T, Schlessinger J (1990). The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J* 9: 4375-80

Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252: 854-856

Masamichi H, Shinobu G, Shinsei M, Nobuyoshi S (1988). Two independent mechanisms for escaping epidermal growth factor mediated growth inhibition in epidermal growth factor receptor-hyperproducing human tumor cells. *J Cell Biol* 107: 791-799

Mennel HD (1980). Significance of Experimental Models in Neurooncology. *Neurosurg. Rev.* 3: 129-137

Mennel HD. Geschwülste des zentralen und peripheren Nervensystems. In: *Spezielle pathologische Anatomie. Band 13/III Pathologie des Nervensystems III*,

edited by Doerr, W. and Seifert, G. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1988, p. 216-540

Mennel HD, Groneck P (1977). Quantitative Aspects of Transplantation of Experimentally Induced Tumors of the Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)* 4: 145-150

Mennel HD, Simon H (1985). Morphology of early stages of ENU-induced brain tumors in rats. *Exp Pathol* 28: 207-214.

Mennel HD (1988a). Establishment and characterization of an intracerebrally transplanted tumor line, induced experimentally in the spinal cord. *Exp Pathol* 33, 165-172

Merlino GT, Ishii S, Wang-Peng J, Knutsen T, Xu YH, Clark AJ, Stratton RH, Wilson RK, Ma DP, Roe BA, et al (1985). Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNA's from A431 human carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 5: 1722-1734

Mizuno M, Yoshida J, Takaoka T, Sugita K (1994). Liposomal transfection of human gamma-interferon gene into human glioma cells and adoptive immunotherapy using lymphokine-activated killer cells. *Journal of Neurosurgery* 80: 510-514

Morton CC, Byers MG, Nakai H, Bell GI, Shows TB (1986). Human genes for insulin-like growth factors I and II are located on 12q22q24.1, 11q15, 4q25-q27, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 41: 245-249

Muller PJ, Wilson BC (1996). Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas. *J Clin Laser Med Surg* 14(5). 263-270

N

Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavennee WK, Huang HJ (1996). A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity

on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56: 5079-5086

Neal DE, Bennet MK, Hall RR, Marsh C, Abel PD, Sainsbury JRC, Harris AL (1985). Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* (8425): 366-368

Nieto-Sampedro M, Broderick JT (1989). A soluble brain molecule related to epidermal growth factor receptor is a mitogen inhibitor for astrocytes. *J Neurosci Res* 22: 28-35

Nieto-Sampedro M (1988). Astrocyte mitogen inhibitor related to epidermal growth factor receptor. *Science* 240: 1784-1786

Nikitin AY, Jin JJ, Papewalis J, Prokopenko SN, Pozharisski KM, Winterhager E, Flesken Nikitin A, Rajewsky MF (1996). Wild type neu transgene counteracts mutant homologue in malignant transformation of rat Schwann cells. *Oncogene* 12: 1309-1317.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavennee WK, Huang HJ (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7727-7731.

Normanno N, Bianco C, Damiano V, De Angelis E, Selvam MP, Grassi M, Magliulo G, Tortora G, Bianco AR, Mendelsohn J, Salomon DS, Ciardiello F (1996). Growth inhibition of human colon carcinoma cells by combinations of anti-

epidermal growth factor-related growth factor antisense oligonucleotides. *Clin Cancer Res* 2: 601-609

O

Olson JJ, Barnett D, Yang J, Assietti R, Cotsonis G, James CD (1998). Gene amplification as a prognostic factor in primary brain tumors. *Clin Cancer Res* 4(1):215-22

O'Rourke DM, Qian X, Zhang HT, Davis JG, Nute E, Meinkoth J, Greene MI (1997). Trans receptor inhibition of human glioblastoma cells by erbB family ectodomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3250-3255.

Ozawa S, Ueda M, Ando N, Abe O, Shimizu N (1987). High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 39: 333-337

P

Petch LA, Harris J, Raymond VW, Blasband A, Lee DC, Earp HS (1990). A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol Cell Biol* 10: 2973-2982

Peterson DL, Sheridan PJ, Brown WE (1994). Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurg* 80, 865-876

Pfeffer S, Ullrich A (1985). Epidermal growth factor: Is the precursor a receptor? *Nature* 313: 184

Preston-Martin S, Staples M, Farrugia H, Giles G (1993). Primary tumors of the brain, cranial nerves and cranial meninges in Victoria, Australia, 1982-1990: Patterns of incidence and survival. *Neuroepidemiology* 12:

Pringent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, Feramisco JR, Cavenee WK, Huang HS (1996). Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 271: 25639-25645

Q

Quigley MR, Flores N, Maroon JC, Sargent B, Lang S, Elrifai A (1995). Value of surgical intervention in the treatment of gliomas. *Stereotact Funct Neurosurg* 65(1-4): 171-175

R

Rainov NG, Dobberstein KU, Bahn H, Holzhausen HJ, Lautenschlager C, Heidecke V, Burkert W (1997). Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival. *Journal of Neurooncology* 35: 13-28

Rasheed BKA, Mc Lendon RE, Friedmann HS, Friedmann A, Fuchs HE, Bigner DD, Bigner SH (1996). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10: 2243-2246

Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT (1995). The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol* 37: 67-73

Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G (1996). Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 822-831

Reiter JL, Maihle NJ (1996). A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res* 24: 4050-4056

Richard I, Beckmann JS (1995). How neutral are synonymous codon mutations? *Nat Genet* 3: 259

Ross A (1992). Molecular Genetics of tumours of the central nervous system. In: Crockard A, Hayward R, Hoff J T (eds.) *Neurosurgery: The scientific basis of clinical practice*, 2nd edn. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, vol 2, 556 - 570

Rubinstein LJ (1972). Tumors of the central nervous system. *Atlas of Tumor Pathology*. AFIP Fascicle 6. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC

S

Saleh M, Stacker SA, Wilks AF (1996). Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res* 56: 393-401

Sambrock J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: *Laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Savage CR, Inagami T, Cohen S (1972). The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 247: 7612-7621

Savage CR, Hash JH, Cohen S (1973). Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 248: 7669-7672

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185.000-M tumour antigen. *Nature* 312: 513-516

Schirmer M (1994). Intrakranielle Tumoren. In: *Neurochirurgie, eine Einführung*. Urban und Schwarzenberg, München/Wien/Baltimore

Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes NE, Kiessling M (1994a). Amplification of the epidermal growth factor receptor gene correlates with different growth behavior in human glioblastoma. *Int J Cancer* 56: 72-77

Schlegel J, Stumm G, Mennel HD (1994b). Chemical carcinogenesis in the nervous system: past and future. *Exp. Toxic. Pathol.* 45: 455-466

Schlessinger J (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *TIBS* 13, 443-447.

Schlessinger J (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *TIBS* 18: 273-275

Schlessinger J, Ullrich A (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9: 383-391

Schmiddek HH (1987) The molecular genetics of nervous system tumors. *Journal of Neurosurgery* 67: 1-16

Schober R, Bilzer T, Waha A, Reifenberger G, Wechsler W, von Deimling A, Wiestler OD, Westphal M, Kemshead JT, Vega F (1995). The epidermal growth factor receptor in glioblastoma: genomic amplification, protein expression, and patient survival data in a therapeutic trial. *Clin Neuropathol* 14: 169-174.

Scott GW, Robles R, Park JW, Montgomery PA, Daniel J, Holmes WE, Lee J, Keller GA, Li WL, Fendly WM, et al. (1993). A truncated intracellular HER2/neu

receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 13: 2247-2257

Seligman AM, Sheer MJ (1939). Studies in carcinogenesis. VIII. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene. *Am. J. Cancer* 37: 364-395

Shalaby MR, Shepard HM, Presta L, Rodrigues ML, Beverley PC, Feldman M, Carter P (1992). Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med* 175: 217-225

Shapiro WR (1986). Therapy of adult malignant brain tumors: what have the clinical trials taught us? *Semin Oncol* 13: 38-45

Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Selker RG, Van Gilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J, Strike TA, Pistenmaa DA (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. *J Neurosurg* 71: 1-9

Singh J, Dobrusin EM, Fry DW, Haske T, Whitty A, McNamara DJ (1997). Structure based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinase. *J Med Chem* 40: 1130 - 1135

Sizeland AM, Burgess AW (1992). Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. *Mol Biol Cell* 3: 1235-1243

Smithgall TE (1995). SH2 and SH3 domains: potential targets for anti-cancer drug design. *J Pharmacol Toxicol Methods* 34: 125–132

Staneczek W (1984). Neubildungen bei Kindern in der DDR. *Arch Geschwulstf* 54: 357–364, aus: Staneczek W und Jänisch W (1994). Epidemiologie der primären Tumoren des Zentralnervensystems bei Kindern und Jugendlichen. *Der Pathologe* 15: 207–215

Stea B, Rossman K, Kittelson J, Lulu B, Shetter A, Cassady JR, Hamilton A (1994). A comparison of survival between radiosurgery and stereotactic implants for malignant astrocytomas. *Acta Neurochir* 62: 47-54 (Supplement)

Steiner HH, Herold-Mende C, Bonsanto M, Geletneky K, Kunze S (1998). Zur Prognose von Hirntumoren: Epidemiologie, Überlebenszeit und klinischer Verlauf. *Versicherungsmedizin* 50: 173-179

Suchenwirth RMA (1982). Hirntumoren. *Münch Med Wschr* 124: 83-88

Sweet WH, Bailey P (1941). Experimentel production of intracranial tumors in the white rat. *Arch Neurol Psych* 45: 1047-1049

I

Tang P, Steck PA, Yung WKA (1997). The autocrine loop of TGF- β /EGFR and brain tumors. *J Neuro-Onc* 35: 303-314

Tansley K, Wilson CW (1947). Irradiation of experimental cerebral tumors. *Radio-logy* 49: 69-72

Tapscott SJ, Miller AD, Olson JM, Berger MS, Groudine M, Spence AM (1994). Gene therapy of rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8185-8189

Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblasto-

mas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(7): 684-689

U

Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA, et al. (1994) Transcriptional regulation of fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9009-9013

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield

MD, Seeburg PH (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425

Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212

V

Varmus HE (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annual review of Genetics* 18: 553-612

Venter DJ, Thomas DGT (1991). Multiple sequential molecular abnormalities in the evolution of human gliomas. *Br J Cancer* 63: 753-757

von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H et al (1992a). p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytomas. *Cancer Research* 52: 2987-2990

von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD (1995). Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15: 328-338

W

Walker MD, Green SB, Byar DP, Batzdorf AE, Brooks U, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Owens G, Ransohoff J, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Wilson CB, Strike TA (1980). Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant gliomas after surgery. *New England Journal of Medicine* 303: 1323-1329

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain-Pathology* 6: 217-223; discussion 23-24

Weber W, Gill GN, Spiess J (1984). Production of an epidermal growth factor receptor-related protein. *Science* 224: 294-297

Wells A, Welsh JB, Lazar CS, Wiley HS, Gill GN, Rosenfeld MG (1990). Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* 247: 962-964

Werner MH, Phuphanich S, Lyman GH (1995). The increasing incidence of malignant gliomas and primary central nervous system lymphoma in the elderly. *Cancer* 76: 1634-1642

Wiestler OD, Brustle O, Eibl RH, Radner H, Aguzzi A, Kleihues P (1992). Retrovirus-mediated oncogene transfer into neural transplants. *Brain Pathol* 2: 47-59

Winger MJ, Mac Donald DR, Cairncross JG (1989). Supratentorial anaplastic gliomas in adults. *J Neurosurg* 71: 478-493

Wong AJ, Pupert JM, Bigner SH, Greschik CH (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2965-2969

Wrann MM, Fox CF (1979). Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing epidermal carcinoma cell line. *J Biol Chem* 254: 8083-8086

Y

Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, Tamaoki N, Kawamoto T, Taniguchi S, Shibuya M (1988). Amplification of the structurally and functionally altered epider

mal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 8: 1816-1820

Yoshida J, Cravioto H (1978). Nitrosourea-induced brain tumors: an in vivo and in vitro tumor model system. *J Natl Cancer Inst* 61: 370-378

Z

Zabel BU, Eddy RL, Lalley PA, Scott J, Bell GI, Shows TB (1985). Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the β -subunit of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 460-473

Zimmermann HM, Arnold H (1943). Experimental brain tumors II. Tumors produced by benzpyrene. *Am J Pathol* 19: 939-955

Zülch KJ (1986). Brain tumors. *Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo*

8 Anhang

8.1 Curriculum vitae

Name	Kühne
Vorname	Christian Alexander
Eltern	Dr. Eckehard und Gisela Kühne
Geb.-Datum	14.01.1970
Geb.-Ort	Dortmund
Wohnort	Schützenstr. 8 35039 Marburg

Schul- und Berufsausbildung

08/76 – 07/80	Wartburg-Grundschule Münster/Westfalen
08/80 – 05/90	Schiller-Gymnasium Münster/Westfalen
Mai 1990	Abitur
10/90 – 10/91	Zivildienst Herz-Jesu-Krankenhaus in Münster/Westfalen
10/91	Beginn des Studiums der Humanmedizin in Marburg
09/93	Ärztliche Vorprüfung
03/95	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1995 – 1997	Famulaturen in den Fächern Chirurgie (Dr. med. P. Pfortner, Essen), Rechtsmedizin (Prof. Dr. med. B. Brinkmann, Münster), Pathologie (Prof. Dr. med. C. Thomas, Marburg), Neurologie (Prof. Dr. med. W. H. Oertel, Marburg), Dermatologie (Dr. med. E.-G. Gensch, Marburg)
03/97	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/97 – 10/98	Praktisches Jahr am Zentralkrankenhaus Reinkenhede in Bremerhaven (Innere Medizin Prof. Dr. med. M. Anlauf; Unfall-/Allgemeinchirurgie, Prof. Dr. med.

H. Seiler/PD Dr. med. H. Böttcher; Neurochirurgie, Dr.
med. E.-G. Mahlmann)

10/98 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in den
Fächern: Innere Medizin, Unfallchirurgie, Neurochirurgie und Anästhesie

10/98 Abschluß des Studiums der Humanmedizin an der
Universität Göttingen; Gesamtnote: 1.66

10/98 Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Anatomie
und Zellbiologie in Marburg bei Prof. Dr. med. E. Wei-
he

8.2 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Molekulargenetische Charakterisierung des Gens für den Rezeptor des Epidermalen Wachstums-Faktor an experimentell erzeugten Hirntumoren der Ratte* im Med. Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von PD Dr. med. J. Schlegel mit Unterstützung von Prof. Dr. med. HD. Mennel ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

8.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer/Innen waren:

in Marburg

Aumüller	Hilgermann	Riedmiller
Arnold	Hofbauer	Richter
Braun	Kern	Schachtschabel
Fruhstorfer	Mannheim	Schlegel
Geus	Mennel	Schneider
Gröne	Oertel	Unsicker
Grzeschik	Paul	von Wichert
Happle	Radsack	Westermann

in Bremerhaven

Ackermann	Dittrich	Sander
Anlauf	Hardt	Seiler
Böttcher	Neuhaus	Wieber

8.4 Danksagung

Wem gilt mein Dank? Zuerst einmal denjenigen, die mir direkt oder indirekt bei der Durchführung und Vollendung meiner Arbeit geholfen haben. Dies waren in erster Linie:

Herr PD Dr. med. J. Schlegel, dem ich für die Bereitstellung des Themas, seine intensive Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft danken möchte.

Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Mennel sei Dank für die vielen Freiheiten, die ich in seiner Abteilung genoß und für die sehr, sehr freundliche Art und Weise im Umgang miteinander.

Bei Guido Piontek möchte ich mich für seine geduldige Einarbeitung in die Welt der molekularbiologischen Arbeitsweisen bedanken; wie auch bei allen anderen Mitarbeitern und Mitstreitern der Arbeitsgruppe.

Ebenso gilt in gleicher Weise Herrn Dr. med. Gunther Wennemuth mein Dank, der bei allem was mit Computertechnik zutun hatte, nicht wegzudenken ist. Auch wenn ich wüste Beschimpfungen über mich ergehen lassen mußte: „das war ein super Sommer...“

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. rer. nat. Heiner Renneberg, der während der Monate dauernden Schlußphase meiner Arbeit zu einem unersetzbaren Freund geworden ist und mich unentwegt anspornte, sowie bei seiner Frau, Dr. rer. nat. Anke Friedetzky, die maßgeblich an der Korrektur beteiligt war und deren konstruktive Kritik dem Diskussionsteil sehr zu gute kam.

Bei Herrn Dr. med. Johannes Tebbe – obwohl erst sehr spät dazu zugestoßen – für seinen ebenfalls maßgeblichen Anteil an der Korrektur der Arbeit. Obwohl in finalen Hochzeitsvorbereitungen begriffen, hat er sich nicht abhalten lassen, meine Arbeit zu lesen und mir wertvolle Hinweise zu geben. Danke auch für den Champagner!

Letztendlich gilt mein Dank natürlich auch jenen Personen, die eigentlich keinen direkten Anteil an dieser Arbeit haben: nämlich meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich niemals gedrängt haben, mir im Gegenteil sämtliche (gerade außeruniversitären) Freiheiten ließen.